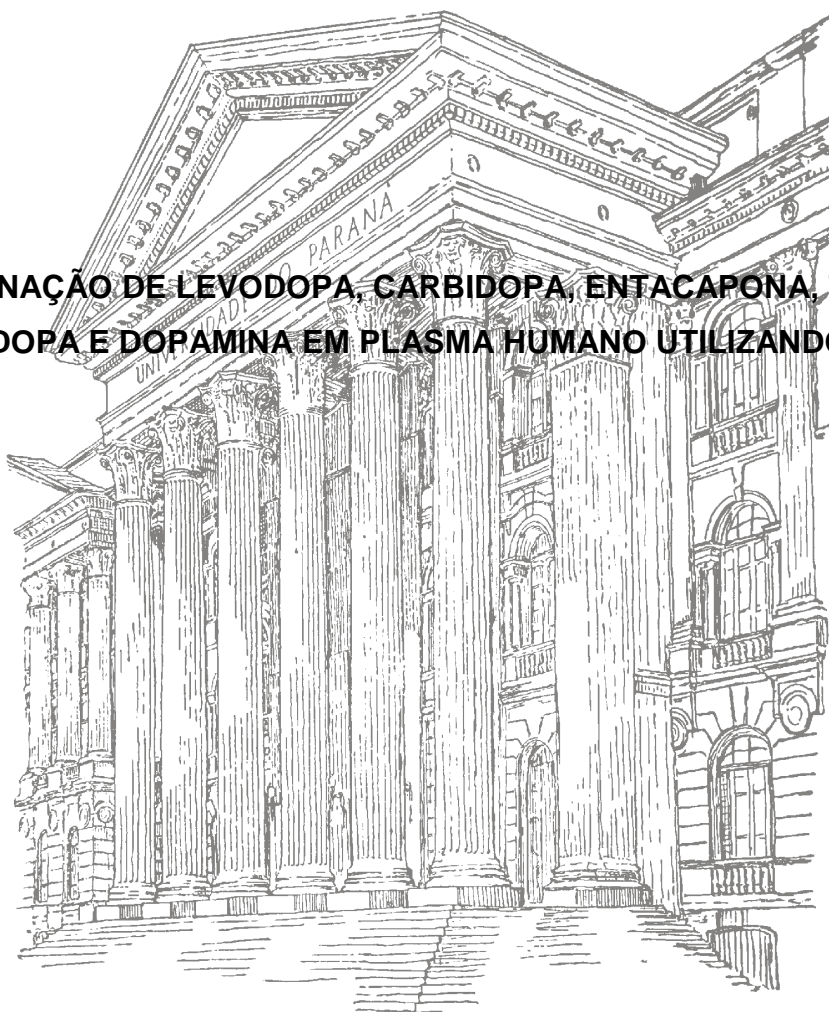


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RÔMULO PEREIRA RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA,
3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CLAE-EM/EM**



CURITIBA

2014

RÔMULO PEREIRA RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA,
3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CLAE-EM/EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre.

Orientador: Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Dr. João Cleverson Gasparetto

CURITIBA

2014

Ribeiro, Rômulo Pereira

Determinação de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em plasma humano utilizando CLAE-EM/EM / Rômulo Pereira Ribeiro – Curitiba, 2014.

111 f. : il ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. João Cleverson Gasparetto

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. CLAE-EM/EM. 2. Levodopa. 3. Carbidopa. 4. Entacapona. 5. Tolcapona. 6. 3-O-metildopa. 7. Dopamina. 8. Doença de Parkinson. I. Pontarolo, Roberto. II. Gasparetto, João Cleverson. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 616.833

TERMO DE APROVAÇÃO


RÔMULO PEREIRA RIBEIRO

Título: "DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CLAE-EM/EM"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador


Dra. Thais Martins Guimarães de Francisco
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 25 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que me acompanharam e me motivaram durante este período de mestrado.

Aos meus pais, Luzia Yuri Ribeiro e Pedro Pereira Ribeiro, pela educação que recebi, pelo incentivo e também, pela ajuda no transporte de casa ao laboratório na época que estava com o pé quebrado.

À toda minha família que me traz felicidade quando está reunida, principalmente na presença de meus sobrinhos Melina e Benício.

Aos amigos Michel Salamanca Coelho, Letícia Paula Leonart, Francis José Zortéa Merino, Ana Carolina Gimenez, Raquel de Oliveira Vilhena, Helena Hiemisch Lobo Borba, Suelem Tavares da Silva Penteado, Flávia Degaut, Juliana Cibi Amorin, Caroline Paola Uber, Letícia Bonâncio Cerqueira, Mário Sérgio Piantavini, Victor Concentino, Paulo Roberto Monteiro de Carvalho, Isabela Friebe, Alexandra David Piedade, Samanta Daliana Golin Pacheco e Luna Assis Gonçalves, pelos bons momentos de descontração e ajuda no laboratório.

Aos professores Francinete Ramos Campos, Ângela Badaró Trindade, Astrid Wiens e Alan Guilherme Gonçalves, pela amizade e pelo conhecimento científico ensinado.

Ao Hemepar por ceder bolsas de plasma branco, hemolisado e lipêmico para este projeto.

À agência de fomento à pesquisa CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao doutorando Cleverson Antônio Ferreira Martins que se mostrou uma grande pessoa e um grande amigo neste período de mestrado.

À Thais Martins Guimarães pela amizade, companheirismo e conselhos dados no decorrer do meu projeto.

Em especial, ao João Cleverson Gasparetto, que disponibilizou do seu tempo para ajudar no desenvolvimento e validação do meu método. Obrigado por seus ensinamentos e principalmente por sua amizade.

E ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo que me aceitou como orientado e, junto com seus demais orientados, trabalhou incansavelmente para que todos consigam se desenvolver e chegar a seus objetivos.

“Não encontre defeitos, encontre soluções.

Qualquer um sabe queixar-se.

Henri Ford”

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido e validado um método para quantificação simultânea de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em plasma, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). A fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operada no modo positivo de ionização foi o mecanismo mais eficiente para ionizar os compostos de interesse. Na cromatografia, foi utilizada uma coluna XBridge C8 (150 x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm) mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta de um gradiente entre água e acetonitrila:metanol (90:10, v/v) ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. A extração dos analitos foi realizada por meio da precipitação de proteínas com acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. Dados da validação demonstraram que o método é seletivo e não sofre efeito residual e de matriz. O método foi considerado sensível por apresentar baixos limites de detecção (5 ng/mL para levodopa; 7 ng/mL para a carbidopa; 1 ng/mL para entacapona; 1,5 ng/mL para tolcapona; 2,5 ng/mL para 3-O-metildopa; 1,25 ng/mL para dopamina) e baixos limites de quantificação (20 ng/mL para levodopa; 30 ng/mL para a carbidopa; 5 ng/mL para dopamina e 10 ng/mL para entacapona, tolcapona e 3-O-metildopa). As curvas de calibração apresentaram um coeficiente de correlação linear $\geq 0,9948$ ao longo do intervalo de 20-1000 ng/mL para levodopa, 30-600 ng/mL para carbidopa, 10-750 ng/mL para entacapona, 10-500 ng/mL para tolcapona, 10-1000 ng/mL para 3-O-metildopa e 5-500 ng/mL para dopamina. Nos diferentes níveis de concentração das amostras controle, o método apresentou precisão (CV%: $\leq 11,31\%$) e exatidão (ER%: $\leq 11,88\%$). O estudo de estabilidade mostrou que, nas condições normais de trabalho do laboratório, a levodopa, carbidopa, 3-O-metildopa, dopamina e metildopa são facilmente degradadas tanto em plasma quanto em solução. A recuperação dos analitos utilizando precipitação de proteínas foi maior que 59,15% com variações de reprodutibilidade menores que 8%. O método validado foi aplicado no plasma de pacientes com doença de Parkinson que estavam em tratamento com o medicamento Stalevo® (100 mg de levodopa, 25 mg de carbidopa e 200 mg de entacapona) e quantificou com sucesso os fármacos levodopa, carbidopa e entacapona e os metabólitos da levodopa (3-O-metildopa e dopamina). Portanto, o método pode ser utilizado como uma ferramenta bioanalítica para acompanhar o tratamento de pacientes com a doença de Parkinson e promover a segurança e eficácia clínica da dose medicamentosa administrada.

Palavras-chave: CLAE-EM/EM, levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa, dopamina, Parkinson.

ABSTRACT

An HPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa and dopamine in human plasma was developed and validated in this study. The electrospray ionization source was operated in positive ion mode. The chromatographic separation was achieved using a XBridge C8 column (150 x 4.6 mm; 5 μ m particle size). The mobile phase consisted of a gradient of water and acetonitrile:methanol (90:10, v/v), both containing 0.1% formic acid. The extraction of the analytes was performed by protein precipitation with acetonitrile (0.1% formic acid). The validation procedures showed that the new method is selective and free of residual and matrix effects. The high sensitivity of the developed method was demonstrated by the low limits of detection (signal-to-noise ≥ 3) estimated at 5.0 ng/mL for levodopa; 7.0 ng/mL for carbidopa; 1.0 ng/mL for entacapone; 1.5 ng/mL for tolcapone; 2.5 ng/mL for 3-O-methyldopa and 1.25 ng/mL for dopamine. The limits of quantification with appropriate precision was estimated at 20.0 ng/mL for levodopa; 30.0 ng/mL for carbidopa; 5.0 ng/mL for dopamine and 10.0 ng/mL for entacapone, tolcapone and 3-O-methyldopa. The calibration curves showed linear correlation coefficient superior to 0.9948 over the range of 20-1000 ng/mL for levodopa, 30-600 ng/mL for carbidopa, 10-750 ng/mL for entacapone, 10-500 ng/mL for tolcapone, 10-1000 ng/mL for 3-O-methyldopa and 5-500 ng/mL for dopamine. Variations from the precision and accuracy were within suitable range (<15%). The stability assay demonstrated that under normal working conditions levodopa, carbidopa, 3-O-methyldopa, dopamine and methyldopa (internal standard) are easily degraded in solution and in plasma. The recovery of the analytes and internal standard (> 59.0%) was achieved after protein precipitation with desirable reproducibility (RSD < 8%). The validated method was applied to evaluate plasmatic levels of levodopa, carbidopa, entacapone, 3-O-methyldopa and dopamine in patients with Parkinson's disease using Stalevo® (100.0 mg of levodopa, 25.0 mg of carbidopa and 200.0 mg of entacapone) and all analytes were successfully determined. Therefore, the method can be used as a bioanalytical tool for monitoring treatment of patients with Parkinson's disease and promote the clinical efficacy and safety of the administered drug dose.

Keywords: HPLC-MS/MS, levodopa, carbidopa, entacapone, tolcapone, 3-O-methyldopa, dopamine, Parkinson.

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN).....	63
EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO UTILIZADO NO ENSAIO DE PRECISÃO.....	63
EQUAÇÃO 3 – CÁLCULO DO ERRO PADRÃO RELATIVO UTILIZADO NO ENSAIO DE EXATIDÃO.....	63
EQUAÇÃO 4 – CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – BIOSÍNTESE DA DOPAMINA.....	25
FIGURA 2 – CORTE FRONTAL DO CÉREBRO HUMANO MOSTRANDO REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL ENVOLVIDOS COM O SISTEMA MOTOR.....	27
FIGURA 3 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS VIAS DIRETA E INDIRETA DO SISTEMA NEURAL SOBRE O CONTROLE MOTOR.....	28
FIGURA 4 – MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS INIBIDORES DAS ENZIMAS MONOAMINA OXIDASE E CATECOL O-METILTRANSFERASE.....	32
FIGURA 5 – ÍONS FRAGMENTOS (m/z) DE MAIOR INTENSIDADE OBTIDOS DA FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DA LEVODOPA (m/z 198,2 Da).....	70
FIGURA 6 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM DE SOLUÇÕES DE ACETONITRILA FORTIFICADAS COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPO-NA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS DE COLUNA.....	72
FIGURA 7 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM DE SOLUÇÕES DE ACETONITRILA FORTIFICADAS COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPO-NA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA UTILIZANDO DIFERENTES FLUXOS DA FASE MÓVEL.....	73
FIGURA 8 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPO-NA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA.....	74
FIGURA 9 – RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPO-NA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO OBTIDA POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES.....	77
FIGURA 10 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DA	

LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA.....	79
FIGURA 11 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DA 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PADRÃO INTERNO METILDOPA.....	80
FIGURA 12 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$	82
FIGURA 13 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$	83
FIGURA 14 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ENTACAPONA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x$	84
FIGURA 15 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TOLCAPONA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$	85
FIGURA 16 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x$	86
FIGURA 17 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x$	87
FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL DA LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA.....	88
FIGURA 19 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL DA 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DOS VOLUNTÁRIOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	53
TABELA 2 – GRADIENTE DE FASE MÓVEL UTILIZADO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	55
TABELA 3 – MASSA MOLECULAR DOS ANALITOS, RAZÃO MASSA/CARGA DOS ÍONS MOLECULARES E SEUS RESPECTIVOS ÍONS FRAGMENTOS E PARÂMETROS DE VOLTAGEM PARA QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÃO INTERNO.....	56
TABELA 4 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	60
TABELA 5 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	61
TABELA 6 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM PLASMA HUMANO.....	81
TABELA 7 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA.....	82
TABELA 8 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA.....	83
TABELA 9 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ENTACAPONA.....	84
TABELA 10 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TOLCAPONA.....	85

TABELA 11 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA.....	86
TABELA 12 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA.....	87
TABELA 13 – VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN) DA LEVODOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, ENTACAPONA, TOLCAPONA E 3-O-METILDOPA CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ...	90
TABELA 14 – RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE-EM/EM.....	91
TABELA 15 – RECUPERAÇÃO OBTIDA POR MEIO DA EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.....	92
TABELA 16 – ESTABILIDADE DA LEVODOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6).....	94
TABELA 17 – ESTABILIDADE DA CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6).....	95
TABELA 18 – CONCENTRAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NOS PLASMAS DOS VOLUNTÁRIOS.....	97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTRUTURAS E pK_a s DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA CARACTERIZADAS E *PADRÃO INTERNO.....	37
QUADRO 2 – MÉTODOS ANALÍTICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA O MONITORAMENTO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPO-NA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-MT	3-metoxiltiramina
3-OMD	3- <i>orto</i> -metildopa
ACN	Acetonitrila
AFO	Ácido fórmico
AMP cíclico	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i> (ionização química à pressão atmosférica)
AV/VL	Núcleos ântero-ventral e ventrolateral do tálamo
BHE	Barreira hematoencefálica
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAD	<i>Collision activation dissociation</i> (gás de colisão)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	<i>Collision energy</i> (energia de colisão)
CEP	<i>Collision cell entrance potential</i> (potencial de entrada da célula de colisão)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-E	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico
CLAE-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CLAE-FLU	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
cps	Contagem por segundo
CQA	Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Amostra de controle de qualidade de diluição
CQM	Amostra de controle de qualidade de média concentração
CQ-LIQ	Amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação
CUR	<i>Curtain gas</i> (gás de interface)
CV	Coeficiente de variação
CXP	<i>Collision cell exit potential</i> (potencial de saída da célula de colisão)
D-Dopa	D-3,4-di-hidroxifenilalanina
DAA	Descarboxilase dos aminoácidos aromáticos
DOPAC	3,4-di-hidroxifenilacético
DP	<i>Declustering potential</i> (potencial de desagrupamento)
EDTA-K ₂	Ácido etilenodiaminotetracético tetrassódico
EP	<i>Entrance potential</i> (potencial de entrada)
ER	Erro relativo
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionização por <i>eletrospray</i>)
ESI+	Fonte <i>eletrospray</i> operando no modo positivo de ionização

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIA	<i>Flow injection analysis</i> (análise por injeção em fluxo)
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GS1	<i>Nebulizer gas</i> (gás de nebulização)
GS2	<i>Turbo gas</i> (gás auxiliar)
IPPPP	Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
IS	<i>Ion spray voltage</i> (voltagem do capilar)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de detecção
L-DOPA	L-3,4-di-hidroxifenilalanina
LIQ	Limite inferior de quantificação
LL	Extração líquido-líquido
LSQ	Limite superior de quantificação
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MAO	Monoamina oxidase
MeOH	Metanol
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i> (monitoramento de reações múltiplas)
N/A	Não se aplica
NC	Não consta
ND	Não detectado
PEGP	Parte externa do globo pálido
PIGP	Parte interna do globo pálido
pKa	Logarítmo negativo da constante de acidez
PP	Precipitação de proteínas
PRSN	Parte reticulada da substância <i>nigra</i>
ppt	Partes por trilhão
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase sólida)
TFA	Ácido trifluoroacético
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
v/v	volume/volume
v/v/v	volume/volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVO GERAL.....	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	22
2.1.1	Biossíntese e degradação da dopamina no SNC.....	24
2.1.2	Receptores dopaminérgicos.....	25
2.1.3	Fisiopatologia da doença de Parkinson.....	26
2.1.4	Tratamento farmacológico para doença de Parkinson.....	29
2.1.4.1	Levodopa.....	29
2.1.4.2	Fármacos associados com levodopa no tratamento da doença de Parkinson.....	31
2.1.4.3	Metabólitos da levodopa na região periférica.....	33
2.1.4.4	Estabilidade das catecolaminas.....	34
2.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS EM ESTUDO.....	35
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
2.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	38
2.3.2	Espectrometria de massas.....	38
2.4	MÉTODOS DE ANÁLISE DISPONÍVEIS NA LITERATURA PARA O MONITORAMENTO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA.....	40
2.5	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	44
2.5.1	Extração por precipitação de proteínas.....	44
2.5.2	Extração líquido-líquido.....	45
2.5.3	Extração em fase sólida.....	46
2.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	47
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1	REAGENTES.....	51
3.2	PADRÕES ANALÍTICOS E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA.....	51
3.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	51
3.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	53
3.5	INSTRUMENTAÇÃO.....	54

3.6	TESTES DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ANALITOS EM ESTUDO EM PLASMA HUMANO.....	57
3.7	PREPARO DA AMOSTRA.....	58
3.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	58
3.8.1	Limites de detecção e quantificação.....	58
3.8.2	Seletividade.....	59
3.8.3	Curva de calibração (linearidade).....	59
3.8.4	Amostras de controle de qualidade.....	61
3.8.5	Efeito residual.....	62
3.8.6	Efeito matriz.....	62
3.8.7	Precisão e exatidão.....	63
3.8.8	Teste de recuperação.....	64
3.8.9	Estabilidade dos analitos e padrão interno em solução.....	64
3.8.9.1	Estabilidade da solução de trabalho em bancada.....	64
3.8.9.2	Estabilidade das soluções estoque em geladeira.....	65
3.8.10	Estabilidade dos analitos e padrão interno em plasma humano.....	65
3.8.10.1	Estabilidade de curta duração.....	65
3.8.10.2	Estabilidade pós-processamento.....	66
3.8.10.3	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	66
3.8.10.4	Estabilidade de longa duração.....	67
3.9	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS PACIENTES.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM.....	69
4.2	EXTRAÇÃO.....	75
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	78
4.3.1	Seletividade.....	78
4.3.2	Limite de detecção e quantificação.....	81
4.3.3	Curva de calibração (linearidade).....	81
4.3.4	Efeito residual.....	88
4.3.5	Efeito matriz.....	89
4.3.6	Precisão e exatidão.....	90
4.3.7	Teste de recuperação.....	92
4.3.8	Estabilidade.....	93
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	96
5	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO 1	108

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças neurodegenerativas mais frequentes, o Parkinson é a segunda em prevalência, afetando cerca de 1% da população acima dos 50 anos de idade (SHASTRY, 2001). O Parkinson é uma doença neurológica, crônica e progressiva que é caracterizada por problemas no sistema motor (BAKER; GERSHANIK, 2006). Os sintomas característicos são tremor em repouso, rigidez muscular, acinesia (escassez dos movimentos), bradicinesia (lentidão dos movimentos) e diminuição nos reflexos posturais (GOOLE; AMIGHI, 2009).

Os sinais e sintomas da doença de Parkinson são decorrentes da diminuição da produção de dopamina, a qual é provocada pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância *nigra* do sistema nervoso central (SNC). Os baixos níveis deste neurotransmissor desencadeiam um desequilíbrio no sistema motor regulado pelo córtex cerebral e gânglios basais, levando aos sinais e sintomas mencionados (GOOLE; AMIGHI, 2009).

O diagnóstico da doença de Parkinson é realizado a partir do aparecimento dos sinais e sintomas juntamente com o exame de imagem (exemplo: tomografia de emissão pósitrons). A perda dos neurônios dopaminérgicos é um fenômeno normal no ser humano, entretanto quando a perda dos neurônios dopaminérgicos é superior a 60%, a doença de Parkinson é diagnosticada (GOOLE; AMIGHI, 2009). O tratamento pode envolver cirurgia e até atividades físicas, mas a terapia com medicamentos é a mais utilizada e mundialmente convencionada (UITTI, 2012).

Sem o devido tratamento farmacológico, em 5 a 10 anos esta doença progride para estado de rigidez impossibilitando o autocuidado. Nos casos mais graves, a doença pode levar a morte, devido a complicações como embolia pulmonar ou pneumonia por aspiração (STANDAERT; YOUNG, 2010).

Os medicamentos mais utilizados no tratamento do Parkinson são aqueles que utilizam o fármaco levodopa (L-DOPA), o qual é metabolizado em dopamina no SNC. Porém, apenas 1% da levodopa administrada atinge o sistema nervoso central (BUGAMELLI *et al.*, 2011) devido a ampla metabolização do fármaco no organismo por

duas enzimas: a catecol-O-metiltransferase (COMT) e a descarboxilase de aminoácidos aromáticos (DAA), as quais estão presentes no sangue, fígado, pâncreas rins e trato gastrointestinal (HOLTBÄCK; APERIA, 2008; NAGAI *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012). A primeira enzima (COMT) converte a levodopa no metabólito 3-O-metildopa (3-O-MD) enquanto que a segunda (DAA), converte a levodopa em dopamina (NAGAI *et al.*, 2010). Entretanto, a dopamina convertida fora do sistema nervoso central não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e, além disso, provoca reações adversas como náusea e hipotensão (BUGAMELLI *et al.*, 2011).

Sendo assim, torna-se muito interessante do ponto de vista clínico inibir as enzimas conversoras da levodopa, pois quanto menor for a quantidade de levodopa convertida, menor será o efeito colateral da dopamina periférica. Além disso, reduzir a quantidade de levodopa convertida na região periférica significa aumentar a biodisponibilidade do fármaco no SNC, fato que torna o tratamento mais efetivo. Os principais inibidores enzimáticos administrados em conjunto com a levodopa são carbidopa (inibidor da DAA), tolcapona e entacapona (inibidores da COMT) (NAGAI *et al.*, 2010; BUGAMELLI *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012). Todavia, cabe lembrar que o aumento dos níveis plasmáticos de levodopa e/ou suas oscilações pela utilização desses inibidores podem levar a reações adversas como efeitos motores incapacitantes (SEEBERGER; HAUSER, 2007; STANDAERT; YOUNG, 2010).

Como existe uma variabilidade endógena no metabolismo da levodopa, não há dose padrão para esta substância e para os inibidores enzimáticos que garanta uma concentração adequada de dopamina no SNC. Em outras palavras, para garantir a efetividade do tratamento e diminuir os efeitos colaterais, é preciso monitorar os níveis plasmáticos da levodopa, dos inibidores enzimáticos e dos metabólitos formados, objetivando um ajuste de dose (SEEBERGER; HAUSER, 2007).

Atualmente, diversos métodos bioanalíticos são descritos na literatura para a determinação da levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em plasma humano. Esses procedimentos baseiam-se principalmente no uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diferentes detectores, cada um com suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, os métodos que utilizam CLAE com detectores eletroquímico (CLAE-E), ultravioleta (CLAE-UV) e fluorescência (CLAE-FLU)

são bastante utilizados, principalmente por serem técnicas bastante difundidas e comumente utilizadas em laboratórios analíticos (TITUS *et al.*, 1990; KARLSSON; WIKBERG, 1992; RONDELLI *et al.*, 1994; BLANDINI *et al.*, 1997; HEIZMANN *et al.*, 1999; SAGAR; SMYTH, 2000; SAXER *et al.*, 2004; KARIMI *et al.*, 2006; MUZZI *et al.*, 2009; BUGAMELLI *et al.*, 2011; KELLER *et al.*, 2011; NAGAYAMA *et al.*, 2011). No entanto, o uso do CLAE com esses detectores apresentam a desvantagem de obter análises de moderada sensibilidade e seletividade.

A utilização de analisadores de massas acoplado ao cromatógrafo a líquido (CLAE-EM/EM) vem ganhando cenário mundial em análises bioanalíticas dada sua alta seletividade e sensibilidade. Dessa forma, alguns métodos utilizando essa técnica foram recentemente publicados para determinação dos analitos de interesse em plasma humano (YADAV *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010; CÉSAR *et al.*, 2011a; CÉSAR *et al.*, 2011b). Entretanto, apesar da alta seletividade desse procedimento, nenhum dos métodos descritos determina simultaneamente a levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina. Além disso, apenas um desses métodos foi devidamente validado de acordo com as normas modernas de validação (YADAV *et al.*, 2009), ou seja, com garantia de resultados confiáveis.

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em plasma humano. A proposta é que este novo método seja utilizado para monitorar os níveis plasmáticos dessas substâncias em pacientes com doença de Parkinson e, assim, indicar o ajuste de dose para a garantia da segurança e da eficácia clínica destes fármacos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) para quantificação simultânea dos fármacos levodopa, carbidopa, entacapona e tolcapona, e dos metabólitos 3-O-metildopa e dopamina em plasma humano.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros de aquisição dos analitos de interesse no espectrômetro de massas bem como as melhores condições cromatográficas;
- Extrair os analitos de interesse do plasma pela técnica de extração por precipitação de proteínas;
- Aplicar o método desenvolvido e validado para quantificação dos analitos de interesse em amostras de plasma de pacientes com a doença de Parkinson.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A primeira vez que essa doença foi descrita foi em 1817 pelo médico James Parkinson em um manuscrito intitulado “Um ensaio sobre paralisia agitante” ou “Um ensaio sobre paralisia com tremores”. Entre os sintomas mencionados pelo autor, estavam a perda da força muscular, movimento com tremor involuntário e propensão para curvar o tronco para frente sem prejudicar os sentidos e o raciocínio (PARKINSON, 2002). Desse modo, a paralisia com tremores ficou conhecida mais tarde como doença de Parkinson.

Estudos posteriores a de James Parkinson mostraram que esta doença é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada pela combinação de deficiências motoras como o tremor em repouso, rigidez muscular, acinesia (escassez dos movimentos), bradicinesia (lentidão dos movimentos) e a perda dos reflexos posturais (GOOLE; AMIGHI, 2009). A principal causa dessa doença é a perda irreversível dos neurônios dopaminérgicos da região compacta da substância *nigra* do sistema nervoso central, sendo assim considerada uma doença crônica. Os neurônios dopaminérgicos são responsáveis pela produção da dopamina, uma catecolamina envolvida com o controle dos movimentos entre outras funções. A diminuição dos níveis de dopamina provoca um desequilíbrio no sistema motor e o aparecimento dos sinais e sintomas mencionados (STANDAERT; YOUNG, 2010). Eventualmente, junto com a doença de Parkinson, pode haver o aparecimento de sintomas não motores como distúrbios do sono, prejuízos cognitivos, depressão, ansiedade, alterações do olfato, dor (SMITH *et al.*, 2003; LANGSTON, 2006; BALLANGER *et al.*, 2012), problemas gastrointestinais, disfunção sexual e problemas cardiovasculares (SMITH *et al.*, 2003; KHEDR *et al.*, 2013). Esses problemas ocorrem quando a degeneração de neurônios atinge outros tipos de neurônios, além dos dopaminérgicos (BRASIL, 2010a).

Nos estágios finais da doença, essas pessoas podem apresentar um rosto sem nenhuma expressão, com um discurso monótono e arrastado. Também, podem aparecer dificuldades na mastigação e deglutição, constipação, salivação excessiva e incontinência urinária (LEES; HARDY; REVESZ, 2009). O aparecimento dos sinais e sintomas dessa doença ocorre quando cerca de 80% dos nervos terminais do estriado e 60% dos neurônios dopaminérgicos já estão degenerados (SHASTRY, 2001). Além disso, um aspecto que essa desordem neurológica apresenta é o aparecimento de inclusões intracelulares, conhecidas como corpúsculos de Lewy nas regiões degeneradas do SNC (STANDAERT; YOUNG, 2010).

A doença de Parkinson é a segunda em prevalência entre as desordens neurodegenerativas, perdendo apenas para a doença de Alzheimer. Chega a acometer cerca de 1 a 2% da população mundial com idade acima de cinquenta anos (GOOLE; AMIGHI, 2009). Também, em relação a sua incidência, ocorre sem distinção de grupo étnico ou condição socioeconômica (BRASIL, 2010a) e embora as causas sejam desconhecidas, alguns estudos sugerem que aspectos multifatoriais resultantes da combinação de fatores genéticos e ambientais, como exposição a fármacos, dietas e toxinas gerem essa doença (SHASTRY, 2001).

Uma vez que o baixo nível de dopamina no SNC é a causa do Parkinson, um tratamento medicamentoso adequado de reposição dessa catecolamina resulta em uma melhora significativa nos sintomas clínicos desses pacientes. Nesse contexto, a levodopa é o fármaco mais efetivo para tratamento sintomático da desordem (NAGAYAMA *et al.*, 2011). Entretanto, sabe-se que a doença de Parkinson é crônica e o tratamento é de longo prazo. Sabe-se também que o uso prolongado de levodopa pode resultar em reações adversas incapacitantes como as discinesias (movimentos anormais, excessivos e involuntários) (STANDAERT; YOUNG, 2010). Por isso, a compreensão da farmacocinética e o monitoramento da concentração sérica de levodopa são imprescindíveis para um tratamento mais efetivo (NAGAYAMA *et al.*, 2011).

2.1.1 Biossíntese e degradação da dopamina no SNC

Nos gânglios basais, encontram-se os neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância *nigra*. Nesses neurônios, moléculas de tirosina, originadas de uma dieta alimentar de fenilalanina, são transportadas através da BHE para as regiões terminais dos neurônios dopaminérgicos. Após ação das enzimas tirosina hidrolase e descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (DAA), as moléculas de tirosina são convertidas em dopamina (Figura 1) (GOOLE; AMIGHI, 2009; STANDAERT; YOUNG, 2010; van CALCAR; NEY, 2012). Em seguida, a dopamina é estocada em vesículas nos neurônios dopaminérgicos para sua posterior liberação nas fendas sinápticas (LAWLOR; DURING, 2004). Após a liberação, a dopamina é degradada por duas enzimas na fenda pós-sináptica: a monoamina oxidase (MAO), que promove uma desaminação oxidativa no grupo monoamino da molécula de dopamina e a catecol O-metiltransferase (COMT), que incorpora um grupo metila no anel catecol e inativa a ação da dopamina (Figura 1) (GOOLE; AMIGHI, 2009).

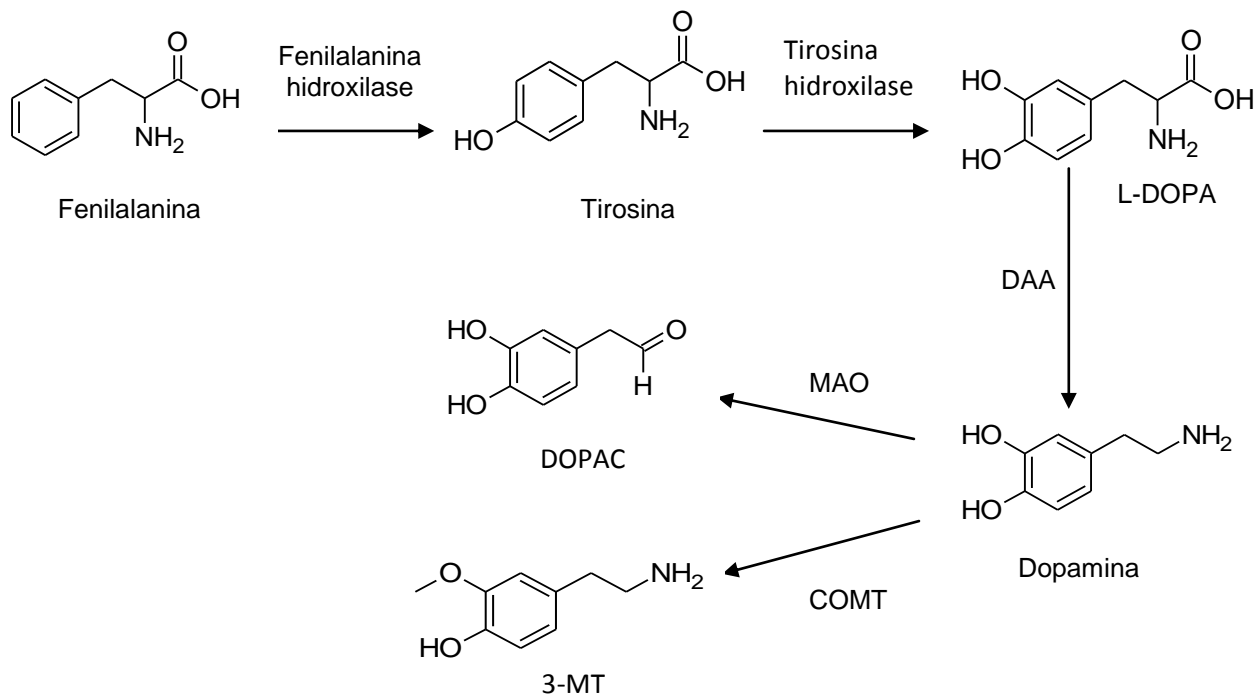


FIGURA 1: BIOSSÍNTESE DA DOPAMINA. Dados: O aminoácido fenilalanina, obtido na dieta proteica alimentar, sofre a ação da enzima fenilalanina hidroxilase no plasma e é convertido em tirosina. Essa tirosina é transportada através a BHE para a região terminal dos neurônios dopaminérgicos, onde sofre a ação da enzima tirosina hidroxilase, sendo metabolizada a L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA). Rapidamente a L-DOPA é convertida em dopamina pela enzima descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (DAA). Na fenda pós-sináptica, a dopamina é degradada pelas enzimas MAO e COMT em ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e 3-metoxiltiramina (3-MT), respectivamente. Fonte: GOOLE; AMIGHI, 2009; van CALCAR; NEY, 2012; modificados.

2.1.2 Receptores dopaminérgicos

Os receptores dopaminérgicos dividem-se em D1 e D2. Estas duas classes estão divididas em outros subtipos, sendo que todos são acoplados à proteína G. Os subtipos de receptores D1 e D5 pertencem à classe D1 e os subtipos D2, D3 e D4 pertencem à classe D2. Enquanto que a primeira classe estimula a síntese do segundo mensageiro intracelular AMP cíclico, a segunda inibe a síntese do mesmo. No entanto, apenas os receptores dopaminérgicos dos subtipos D1 e D2 estão localizados na região do estriado, e por isso, são os mais relacionados com o Parkinson (GOOLE; AMIGHI, 2009; STANDAERT; YOUNG, 2010).

2.1.3 Fisiopatologia da doença de Parkinson

Para o entendimento da doença de Parkinson, é importante conhecer a fisiologia do sistema motor. Na Figura 2, estão mostradas as regiões do cérebro envolvidas no sistema motor e, na Figura 3, pode-se verificar o mecanismo do controle motor pelos gânglios basais, os quais modulam o fluxo de informações que saem do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinhal (STANDAERT; YOUNG, 2010).

A projeção dos neurônios do estriado para fora do mesmo é dividida nas vias direta e indireta. A primeira via estimula o sistema motor, enquanto que a segunda inibe. Estas vias são estimuladas pela dopamina nos receptores dopaminérgicos do subtipo D1 excitatório e D2 inibitório presentes no estriado (STANDAERT; YOUNG, 2010).

O Parkinson ocorre quando há destruição dos neurônios dopaminérgicos localizados na parte compacta da substância *nigra*. Desse modo, níveis de concentração de dopamina abaixo do normal na região do estriado levam a um estímulo da via indireta em detrimento da via direta, gerando uma diminuição de liberação de glutamina ao córtex cerebral. A falta do controle motor do córtex ocasionado pelo menor estímulo da glutamina provoca os sinais e sintomas da doença de Parkinson (GOOLE; AMIGHI, 2009; STANDAERT; YOUNG, 2010).

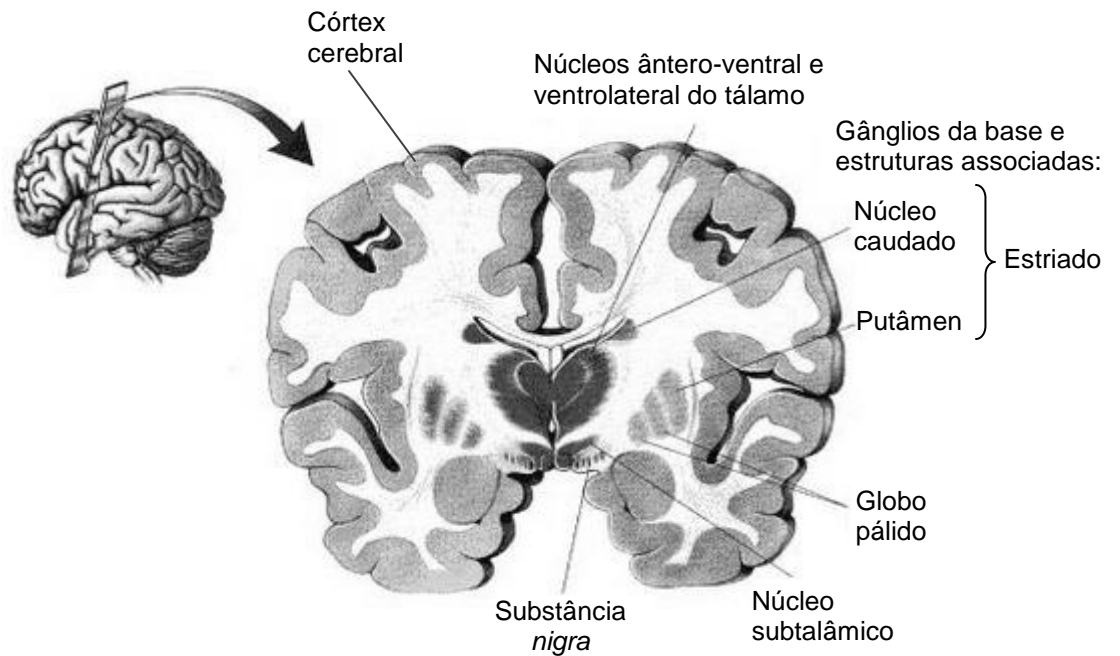


FIGURA 2: CORTE FRONTAL DO CÉREBRO HUMANO MOSTRANDO REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL ENVOLVIDOS COM O SISTEMA MOTOR. Fonte: BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002.

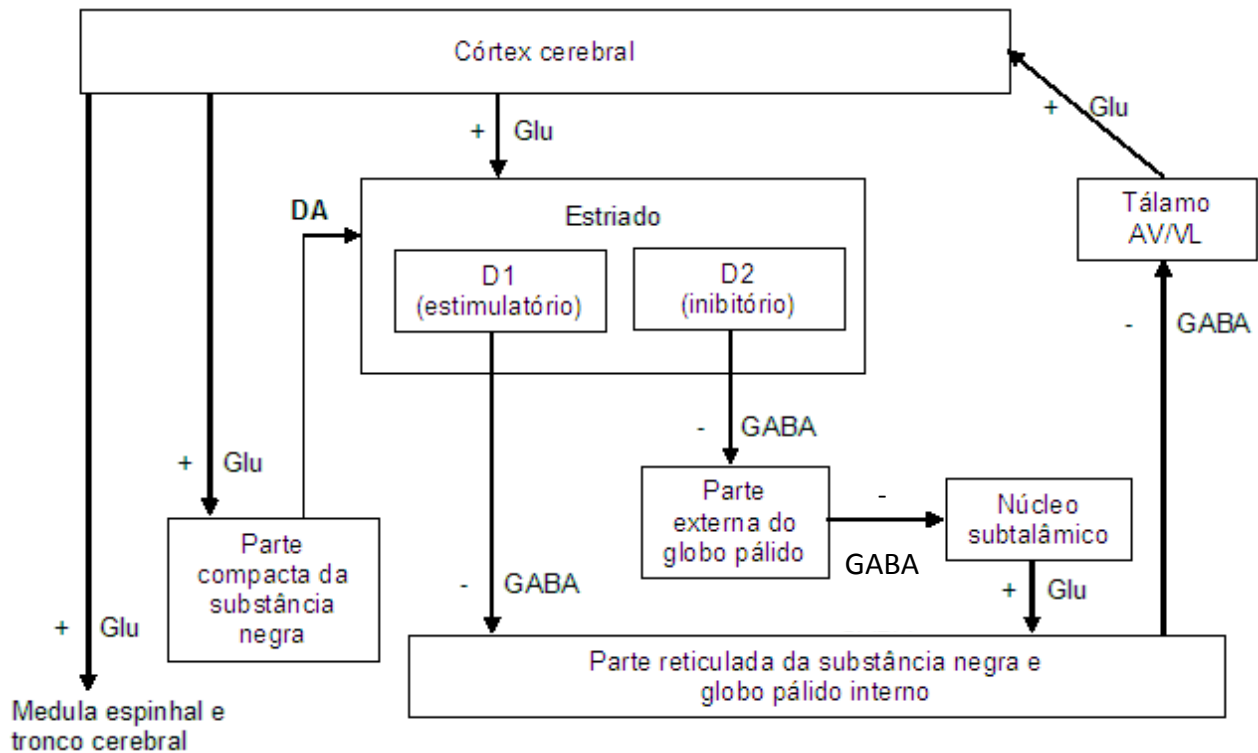


FIGURA 3: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS VIAS DIRETA E INDIRETA DO SISTEMA NEURAL SOBRE O CONTROLE MOTOR. Dados: A parte compacta da substância *nigra* projeta inervações de neurônios dopaminérgicos ao estriado, originando e regulando as atividades das vias direta e indireta. Por sua vez, o estriado, que é uma estrutura dos gânglios basais, recebe estímulos glutamatérgicos excitatórios de muitas partes do córtex cerebral. Dentro do estriado existem neurônios que possuem receptores dopaminérgicos dos subtipos D1 (estimulador do sistema motor) e D2 (inibidor do sistema motor). Na via direta, os neurônios do receptor D1 se projetam da saída dos gânglios basais para a parte reticulada da substância *nigra* (PRSN) e parte interna do globo pálido (PIGP). Quando os receptores do subtipo D1 são estimulados, enviam sinais via transmissor inibitório, o ácido γ -aminobutírico (GABA), para as duas estruturas (PRSN e PIGP). Consequentemente, a PRSN e PIGP são inibidas e deixam de enviar sinal via transmissor inibitório GABA para os núcleos ântero-ventral e ventrolateral do tálamo (tálamo AV/VL). A não inibição destas regiões permite que o tálamo envie sinais de estímulos, via glutamina, ao córtex cerebral, o qual por via glutamina irá estimular a medula espinhal e o tronco cerebral para que estes regulem o controle do sistema motor. No caso da via indireta, os neurônios do receptor do subtipo D2 se projetam da saída dos gânglios basais para a parte externa do globo pálido (PEGP). Quando os receptores D2 são estimulados enviam sinais via transmissor inibitório GABA para a PEGP. Esta estrutura deixa de enviar também GABA para o núcleo subtalâmico fazendo que este último envie sinais de estímulo, via glutamina, para PRSN e PIGP. Estas duas estruturas estimuladas enviam sinais inibitórios (GABA) aos núcleos do tálamo, que por sua vez reduz o estímulo para o córtex cerebral, levando a um menor controle motor. Fonte: BRAAK; DEL TREDICI, 2008; STANDAERT; YOUNG, 2010.

2.1.4 Tratamento farmacológico para doença de Parkinson

2.1.4.1 Levodopa

O tratamento da doença de Parkinson é sintomático (GOOLE; AMIGHI, 2009) sendo a levodopa considerada o fármaco mais efetivo no combate aos sinais e sintomas motores (GONÇALVES *et al.*, 2012). Na forma de levodopa, o fármaco é inativo e só alcança os efeitos terapêuticos quando sofre descarboxilação dentro do sistema nervoso central (SNC), originando a dopamina (BUGAMELLI *et al.*, 2011), uma catecolamina que vai atuar e regular o sistema motor do paciente (STANDAERT; YOUNG, 2010).

Por via oral, a levodopa é absorvida rapidamente na região superior do intestino delgado por um sistema de transporte ativo de aminoácidos aromáticos, o qual também é encontrado na barreira hematoencefálica. Devido ao uso desse sistema de transporte, a administração da levodopa não deve ser realizada junto com uma refeição rica em proteínas. Os aminoácidos provenientes da dieta vão competir com a levodopa prejudicando a absorção do fármaco e consequentemente reduzindo os níveis de concentração plasmática da levodopa (STANDAERT; YOUNG, 2010; NAGAYAMA *et al.*, 2011). As concentrações plasmáticas máximas da levodopa após uma dose oral ocorrem entre 0,5 e 2 horas, com meia vida plasmática entre 1 a 3 horas (STANDAERT; YOUNG, 2010).

A forma ativa da levodopa é a L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA). No entanto, pode-se encontrar uma pequena quantidade de seu isômero, a D-3,4-di-hidroxifenilalanina (D-DOPA) nos medicamentos (KELLER *et al.*, 2011), o qual não se converte em dopamina e pode causar granulocitopenia (GOOLE; AMIGHI, 2009).

Os fatores que podem alterar a taxa de absorção da levodopa são o pH do suco estomacal, a velocidade de esvaziamento gástrico e o período de exposição do fármaco às enzimas de degradação da mucosa do estômago e do intestino. Outro fator importante é que o uso prolongado da levodopa retarda o esvaziamento gástrico e,

como nessa região a enzima descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (DAA) está presente, ocorre degradação do fármaco e consequentemente um prejuízo na absorção do mesmo (NAGAI *et al.*, 2010; KELLER *et al.*, 2011).

Quanto ao fator idade, pode-se dizer que a biodisponibilidade do fármaco é maior em pacientes de 50 anos em relação aos de 20 anos. Embora a absorção seja menor nos pacientes de maior idade, a maior biodisponibilidade está relacionada com a menor taxa metabólica deste grupo. Em relação ao sexo, mulheres possuem maior absorção do fármaco que os homens. Outros fatores que alteram a absorção são o peso corporal e o tempo de ingestão (NAGAYAMA *et al.*, 2011).

A entrada da levodopa no sistema nervoso central ocorre por transporte ativo através de um transportador de aminoácidos aromáticos localizado na barreira hematoencefálica. A levodopa sofre descarboxilação, sendo convertida em dopamina em sua maior parte na região interna pré-sináptica dos neurônios dopaminérgicos do estriado (JIANG *et al.*, 2010; STANDAERT; YOUNG, 2010). A liberação de dopamina nas fendas sinápticas promove os efeitos terapêuticos para a doença de Parkinson, seguido pela sua recaptação ou metabolização pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e a catecol O-metiltransferase (COMT) (STANDAERT; YOUNG, 2010).

A levodopa administrada sofre metabolismo através das enzimas COMT presentes na circulação sanguínea e DAA presente na mucosa do trato gastrointestinal, fígado, pâncreas e rins (HOLTBÄCK; APERIA, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012). A DAA converte a levodopa em dopamina por descarboxilação, enquanto que a COMT converte o fármaco no metabólito 3-O-metildopa (3-O-MD) (NAGAI *et al.*, 2010). Menos de 1% da levodopa inalterada atravessa a barreira hematoencefálica para ser convertida em dopamina (KELLER *et al.*, 2011; BUGAMELLI *et al.*, 2011). Já a dopamina formada na circulação sanguínea não atravessa a barreira hematoencefálica e ainda provoca efeitos adversos como náusea e hipotensão ortostática. A fim de aumentar a fração de levodopa inalterada e diminuir os efeitos colaterais da dopamina formada na circulação e na mucosa intestinal, fármacos inibidores das enzimas de degradação são normalmente administrados (BUGAMELLI *et al.*, 2011).

No início do tratamento com levodopa e com os inibidores enzimáticos da DAA e COMT, verifica-se uma melhora quase total nos sinais e sintomas de tremor, rigidez e

bradicinesia. Ocorre também um aumento na vida plasmática do fármaco, o que sugere algum tipo de capacidade de armazenamento e liberação da dopamina. No entanto, com o tratamento em longo prazo e sem os devidos cuidados no controle das doses desses fármacos, há uma desregulação na capacidade de armazenamento e de liberação da dopamina. Isso gera um encurtamento no tempo do efeito no SNC, normalmente menor que 4 horas, o que é chamado de fenômeno *wearing-off*. Também pode ocorrer uma interrupção súbita do efeito da melhora motora com a volta para os estados de rigidez muscular e acinesia, e isso é conhecido como efeito *on/off* (STACY *et al.*, 2005; BRASIL, 2010a; STANDAERT; YOUNG, 2010; NAGAYAMA *et al.*, 2011). Outras reações observadas são as discinesias, movimentos anormais, excessivos e involuntários. Essas discinesias ocorrem quando há nos pacientes altos níveis de levodopa na circulação sanguínea. Isto vai refletir em altos níveis de dopamina formada no SNC e, como consequência, ocorre dessensibilização nos receptores dos subtipos D1 e D2 no estriado, levando a uma desregulação do sistema motor (GOOLE; AMIGHI, 2009). Segundo BUCK; VOEHRINGER; FERGER (2010), esse tipo de reação adversa ocorre em pacientes que permanecem com concentrações plasmáticas altas de levodopa (cerca de 4 a 6 anos de tratamento). A retirada súbita da levodopa também provoca reações adversas como a síndrome neuroléptica maligna, que consiste nos sintomas de hipertermia, rigidez e confusão mental (STANDAERT; YOUNG, 2010).

A diminuição das reações adversas causadas pela levodopa e a volta dos benefícios no sistema motor ocorrem quando os níveis desse fármaco são mantidos constantes no plasma, sem que haja flutuações ou altas concentrações do mesmo (MOURADIAN *et al.*, 1990).

2.1.4.2 Fármacos associados com levodopa no tratamento da doença de Parkinson

A disponibilidade da levodopa é aumentada na circulação sanguínea quando são administrados fármacos inibidores da atividade das enzimas DAA e COMT, como visto na Figura 4 (BUGAMELLI *et al.*, 2011). A atividade da primeira enzima é inibida pela

administração do fármaco carbidopa (CÉSAR *et al.*, 2011b), enquanto que a segunda, é inibida pelos fármacos entacapona e tolcapona (GONÇALVES *et al.*, 2012).

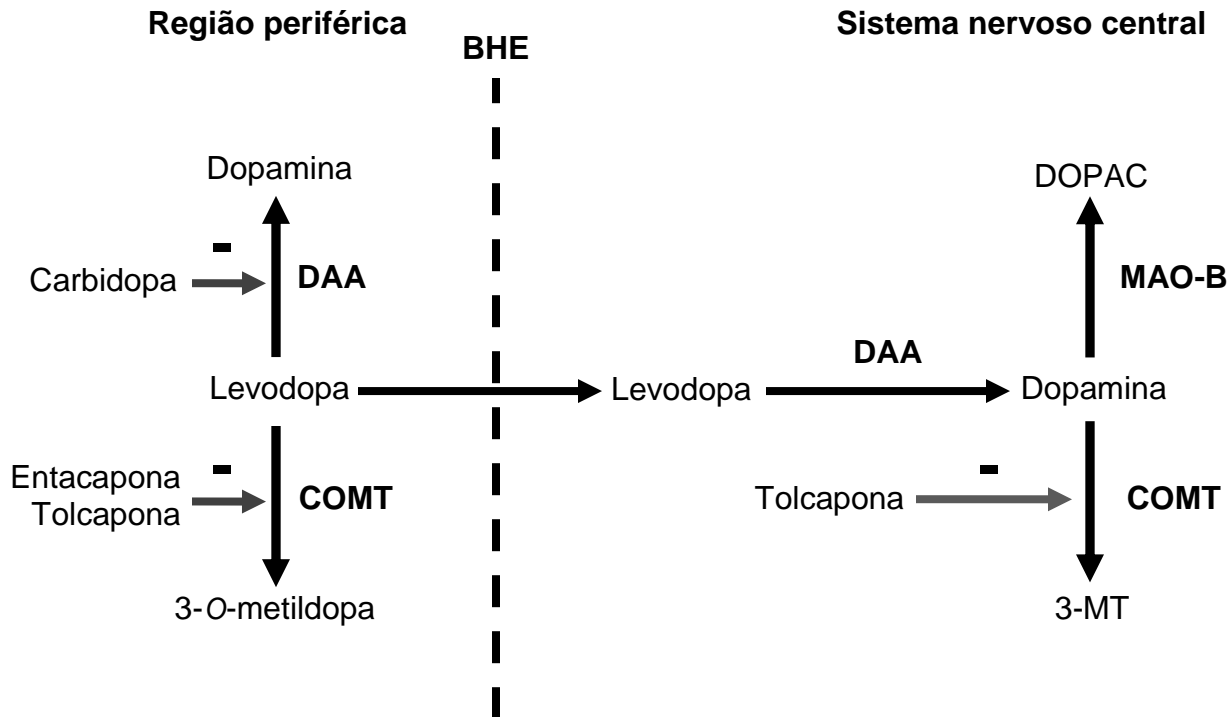


FIGURA 4: MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS INIBIDORES DAS ENZIMAS MONOAMINA OXIDASE E CATECOL O-METILTRANSFERASE. Dados: A levodopa na região periférica é metabolizada pelas enzimas descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (DAA) e catecol-O-metiltransferase (COMT) em dopamina e 3-O-metildopa, respectivamente. A administração de fármacos inibidores dessas enzimas aumenta a disponibilidade da levodopa na região periférica. Enquanto que a enzima DAA é inibida pela carbidopa, a COMT é inibida pela entacapona e pela tolcapona. As inibições por esses fármacos ocorrem nas regiões periféricas, exceto a tolcapona que consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e inibir também a COMT no SNC, diminuindo a metabolização da dopamina em 3-metoxiltiramina (3-MT). Uma outra via de metabolização da dopamina dentro do SNC é através da ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) que converte a dopamina em 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC). Em relação a localização das enzimas DAA e COMT, a primeira se encontra na mucosa do trato gastrointestinal, fígado, pâncreas e rins e a segunda se encontra na corrente sanguínea e no SNC. Fonte: HOLTBACK; APERIA, 2008; STANDAERT; YOUNG, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012.

Os fármacos entacapona e tolcapona são considerados a segunda geração de fármacos inibidores da atividade da enzima COMT. Esses fármacos foram desenvolvidos no final da década de 1980 e têm como característica um grupo nitrocatecol, o qual permite alta potência, seletividade e reversibilidade na ligação com

a enzima (YADAV *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2012). Quando administrados oralmente, são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal (JORGÁ *et al.*, 1999; NAGAI *et al.*, 2010) e apresentam uma concentração máxima em 0,7 h para entacapona e 1,8 h para a tolcapona (GONÇALVES *et al.*, 2012). Esses fármacos sofrem extensiva metabolização de primeira passagem, sendo que a disponibilidade resultante na corrente sanguínea chega a 35% para a entacapona (HEIKKINEN *et al.*, 2002) e 68% para a tolcapona (JORGÁ *et al.*, 2000). A meia-vida de eliminação também é rápida e o principal órgão que realiza a metabolização é o fígado (MÄNNISTÖ; KAAKKOLA, 1999). Para a entacapona, a meia-vida fica em torno de 1,6 – 3,4 h (HEIKKINEN *et al.*, 2002) e para a tolcapona, é aproximadamente 1,9 – 3,0 h (GONÇALVES *et al.*, 2012).

Em relação à eficácia, a tolcapona apresenta maior potencial de inibição da atividade enzimática da COMT em comparação com a entacapona e, além disso, apresenta uma ação mais duradoura. No entanto, devido a hepatotoxicidade da tolcapona, o seu uso foi proibido nos países da Europa (GONÇALVES *et al.*, 2012). Nos países onde o seu uso é permitido, como no Brasil, o fármaco só é administrado na ausência da resposta ao tratamento com outros fármacos (por exemplo, entacapona) e, nestes casos, a função hepática é monitorada por meio dos níveis do aspartato e da alanina aminotransferase (AST e ALT, respectivamente) (NUNES *et al.*, 2009; BRASIL, 2010a; GONÇALVES *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Metabólitos da levodopa na região periférica

Os dois principais metabólitos da levodopa são a dopamina e a 3-O-metildopa. O primeiro, origina-se pela ação da enzima DAA sobre a levodopa na região periférica, enquanto o segundo, é metabolizado pela ação da enzima COMT, como demonstrado na Figura 4 (NAGAI *et al.*, 2010).

A dopamina além de ser formada nos neurônios da substância *nigra* do SNC, também é produzida nas células epiteliais do túbulo proximal nos rins e exerce funções

diuréticas e natriuréticas (LEFKOWITZ; HOFFMAN; TAYLOR, 2010). Em baixas concentrações na região vascular, age nos receptores do tipo D1. Ocorre um aumento na vasodilatação, na taxa de filtração glomerular e na excreção de cátion sódio. Ao se aumentar a concentração plasmática dessa catecolamina, ocorre efeito inotrópico positivo no coração, isto é, um aumento na força de contração. Além disso, promove a liberação da noradrenalina nos terminais nervosos, e dessa forma também contribui para um aumento na pressão sistólica e diastólica. Esse aumento pode provocar reações adversas como hipertensão arterial, taquicardia, arritmia e náusea (HOFFMAN; LEFKOWITZ, 2010). Como dito, a dopamina formada na região periférica não consegue atravessar a BHE e a causa se deve pela ausência de transporte ativo para essa molécula somada a sua natureza hidrofílica (JIANG *et al.*, 2010).

2.1.4.4 Estabilidade das catecolaminas

As catecolaminas, como a levodopa e dopamina, são substâncias derivadas da tirosina. Apresentam certo grau de instabilidade nas condições de bancada (LEFKOWITZ; HOFFMAN; TAYLOR, 2010), pois são facilmente oxidadas em pH fisiológico e em temperatura ambiente. RONDELLI *et al.* (1994) descrevem que para diminuir a velocidade de degradação dessas substâncias podem ser utilizados, no momento da coleta, o etilenodiaminotetracético di-potássico (EDTA-K₂, anticoagulante) e/ou metabissulfito de sódio (conservante). Já MUNOZ *et al.* (2009) relatam que a carbidopa (analito que possui estrutura semelhante de uma catecolamina) sofre degradação pelas enzimas peroxidases e tirosinases encontradas no organismo humano. Estas enzimas atuam por meio de oxidação no grupo polifenol da molécula de carbidopa e, para diminuir esta degradação, é adicionado ácido no plasma coletado.

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANALITOS EM ESTUDO

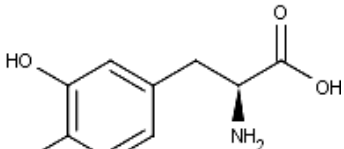
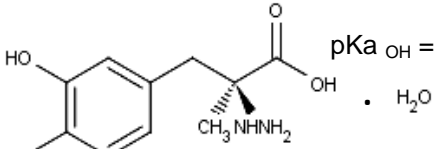
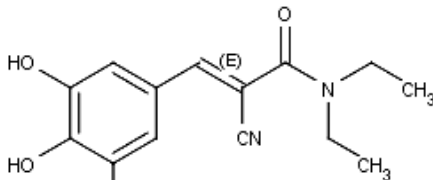
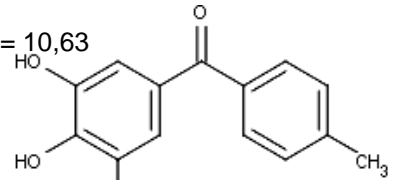
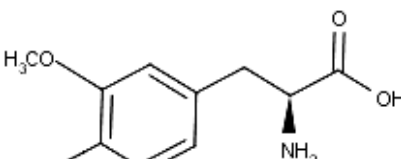
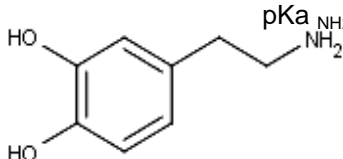
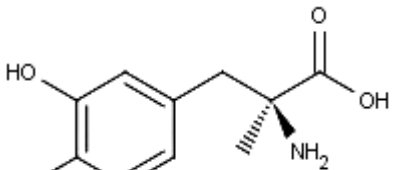
A levodopa (nome IUPAC: ácido 2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil) propanoico; n° CAS: 59-92-7) é um pó branco cristalino ou ligeiramente cor de creme (USP, 2008, BRASIL, 2010b). É pouco solúvel em água, praticamente insolúvel em etanol e éter etílico, facilmente solúvel em ácido clorídrico 1 M e ligeiramente solúvel em ácido clorídrico 0,1 M. (BRITISH, 2009; BRASIL, 2010b). O armazenamento deve ser em recipiente hermeticamente fechado e resistente à luz, devendo ser estocado em ambientes secos e sem aquecimento excessivo (USP, 2008).

A carbidopa mono-hidratada (nome IUPAC: ácido (S)-3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-hidrazino-2-metilpropiónico mono-hidratado; n° CAS: 38821-49-7) é um pó branco ou amarelado. É ligeiramente solúvel em água, muito pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em cloreto de metileno. Dissolve em soluções contendo ácidos minerais (BRITISH, 2009). Deve ser armazenado em recipiente hermeticamente fechado e resistente à luz (USP, 2008).

A entacapona (nome IUPAC: (2E)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxi-5-nitrofenil)-N,N-dietilprop-2-enamida; n° CAS: 130929-57-6) é um pó cristalino de cor amarelo-esverdeado a amarelo e é inodoro. É praticamente insolúvel em água, fracamente solúvel em metanol e ligeiramente solúvel em etanol. Deve ser armazenada em recipiente hermeticamente fechado e protegido da luz (USP, 2008; USP, 2012). Já a tolcapona (nome IUPAC: 5-(4-metilbenzoil)-3-nitrobenzeno-1,2-diol; n° CAS: 134308-13-7) se apresenta como um pó cristalino amarelo de odor fraco ou inodoro. Este fármaco é insolúvel em água e solúvel em metanol. Deve ser armazenado em recipiente hermeticamente fechado e resistente à luz e estocado em temperatura ambiente entre 20 a 25 °C (USP, 2008; USP, 2012). Tanto a tolcapona quanto a entacapona possuem características lipofílicas (FOSBERG *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2012).

O cloridrato de dopamina (nome IUPAC: cloridrato de 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol; CAS: 62-31-7) é caracterizado por ser um pó cristalino de cor branco ou quase branco. É muito solúvel em água e solúvel em etanol (BRITISH, 2009). Deve ser armazenado em recipiente hermeticamente fechado, seco, protegido da luz e à

temperatura de 2-8 °C (SIGMA, 2012). A 3-O-metildopa (nome IUPAC: ácido 2-amino-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propanóico; n° CAS: 7636-26-2) é um pó sólido, incolor e insolúvel em água a qual deve ser armazenada em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e calor (USP, 2012). Quanto o padrão interno, metildopa (nome IUPAC: ácido (S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-metilpropanoico; n° CAS: 41372-08-1), esta se apresenta como um pó branco pouco solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em água e muito solúvel em ácidos minerais diluídos (EUROPEAN, 2007). Deve ser armazenada em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e calor (SIGMA, 2012). As estruturas químicas, pka, fórmula molecular e massa molecular de cada substância estão descritos no Quadro 1.

<p style="text-align: center;">Levodopa</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{NH_2} = 8,03$</p> <p>Fórmula molecular: $C_9H_{11}NO_4$ MM: 197,19 Da</p>	<p style="text-align: center;">Carbidopa mono-hidratada</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{OH} = 3,59$ $pK_a_{NH_2} = 5,65$</p> <p>Fórmula molecular: $C_{10}H_{14}N_2O_4 \cdot H_2O$ MM: 244,29 Da (puro=226,23 Da)</p>
<p style="text-align: center;">Entacapona</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{OH} = 5,68$</p> <p>Fórmula molecular: $C_{14}H_{15}N_3O_5$ MM: 305,29 Da</p>	<p style="text-align: center;">Tolcapona</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{OH} = 10,63$ $pK_a_{OH} = 5,17$</p> <p>Fórmula molecular: $C_{14}H_{11}NO_5$ MM: 273,24 Da</p>
<p style="text-align: center;">3-O-metildopa</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{NH_2} = 9,33$</p> <p>Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}NO_4$ MM: 211,22 Da</p>	<p style="text-align: center;">Cloridrato de Dopamina</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{NH_2} = 9,27$</p> <p>Fórmula molecular: $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$ MM: 189,64 Da (puro = 153,08 Da)</p>
<p style="text-align: center;">Metildopa*</p>  <p style="text-align: center;">$pK_a_{NH_2} = 9,85$</p> <p>Fórmula molecular: $C_{10}H_{13}NO_4$ MM: 211,08 Da</p>	

QUADRO 1: ESTRUTURAS E pKas DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA CARACTERIZADAS E *PADRÃO INTERNO. Dados: Da: Dalton; pKa: logaritmo negativo da constante de acidez; MM: massa molecular; *padrão interno. Fonte: Chemicalize, 2013.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

2.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica que permite realizar separações e quantificar compostos presentes em vários tipos de amostras com alta eficiência, resolução e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O princípio da separação cromatográfica é baseado nas interações entre soluto e fase estacionária e nas características físico-químicas de cada composto. A obtenção de uma separação mais adequada depende da natureza, polaridade, caráter iônico e massa molecular do composto e do tipo de interação deste com as fases móvel e estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Os modos de separação existentes são a cromatografia de fase reversa e a de fase normal. A primeira consiste em uma fase estacionária de baixa polaridade e uma fase móvel de maior polaridade. Já na segunda, essas polaridades são invertidas (TONHI *et al.*, 2002).

Com relação aos detectores, nas últimas décadas foram desenvolvidos vários tipos como aqueles que trabalham com comprimentos de ondas variáveis, por fluorescência, espalhamento de luz, índice de refração e eletroquímico. Também se tornou possível o acoplamento do CLAE com o espectrômetro de massas. Esse acoplamento permitiu a detecção de uma faixa mais ampla de compostos, em baixas concentrações e presentes em amostras complexas como sangue, urina, petróleo e alimentos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.3.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é o estudo da matéria através da geração de íons, os quais devem estar em fase gasosa, e da sua caracterização pela carga, massa,

estrutura ou propriedades físico-químicas. O espectrômetro de massas é um instrumento que mede a relação massa/carga (m/z) dos compostos ionizados da matéria analisada (VESSECCHI *et al.*, 2011). A técnica possibilita a determinação de diversos elementos com elevada sensibilidade, na faixa de partes por trilhão (ppt), e com capacidade multielementar (BRASIL, 2010b).

O espectrômetro de massas possui três componentes principais: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector. O primeiro componente converte as moléculas em íons em fase gasosa. No analisador, ocorre a separação e análise de massa do íon molecular e, caso haja célula de colisão, também de seus fragmentos com carga. O último componente é o detector, o qual é responsável pela medida, amplificação e exibição da corrente de íons gerada por meio de um espectrômetro de massas (DASS, 2007a).

A fonte de ionização, que converte moléculas em espécies gasosas iônicas, pode trabalhar em pressão atmosférica normal ou a baixas pressões. Em geral, as técnicas de ionização mais utilizadas são APCI (*atmospheric-pressure chemical ionization*) e ESI (*electrospray ionization*) (DASS, 2007b).

O APCI é um método de ionização que se aplica na análise de compostos termoestáveis e pouco polares, em geral massas superiores a 1500 Da (DASS, 2007b). A ionização ocorre quando uma amostra (na forma de gás ou líquido nebulizado) é submetida a uma descarga corona por um eletrodo de descarga elétrica à pressão atmosférica (VESSECCHI *et al.*, 2011).

A ionização por ESI é um processo que produz uma pulverização fina de gotículas altamente carregadas de analitos termoestáveis. Ocorre quando uma mistura de solução da amostra com um solvente adequado flui através de um tubo capilar de aço inoxidável. Esse tubo é submetido a um alto potencial de tensão (3 a 5 kV) com as paredes da região sob pressão atmosférica ambiente. A diferença de potencial entre a ponta do capilar e o eletrodo produz um campo eletrostático suficientemente forte para dispersar a solução que emerge em forma de fina névoa de partículas carregadas. A evaporação ocorre ao submeter estas partículas a um fluxo quente de nitrogênio. Os íons, então, são transportados de uma região com pressão atmosférica ambiente para

uma região de alto vácuo do analisador de massas. O aquecimento e a alta velocidade do gás auxiliam na dispersão das gotículas originadas do CLAE (DASS, 2007b).

Para chegar ao analisador de massas, os íons selecionados são focalizados por uma série de cilindros ou placas metálicas submetidas a uma diferença de potencial, usualmente na faixa de 2 a 15 V de corrente contínua. Um analisador de massas é dito quadrupolo ao ser formado por quatro barras metálicas cilíndricas do mesmo comprimento e diâmetro. Nelas é aplicada uma combinação de corrente contínua e alternada aos eletrodos (que são as barras metálicas) e somente íons com determinada razão massa carga (m/z) são conduzidos através do quadrupolo (BRASIL, 2010b).

O analisador de massas mais utilizado em ensaios bioanalíticos é do tipo triplo quadrupolo. Esse analisador é composto por dois quadrupolos de transmissão montados em série e um quadrupolo situado entre os dois quadrupolos de transmissão, que funciona como célula de colisão. Na célula de colisão ocorre a quebra do íon selecionado por um gás de colisão (VESSECCHI *et al.*, 2011), fato que permite análises de alta seletividade devido ao monitoramento exclusivo dos íons fragmentos gerados. Essa técnica é conhecida como espectrometria de massas sequencial, espectrometria massa/massa ou espectrometria de massas com recursos *Tandem* (EM/EM) (VESSECCHI *et al.*, 2011).

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DISPONÍVEIS NA LITERATURA PARA O MONITORAMENTO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA

Na literatura, vários métodos envolvendo o uso da cromatografia líquida com diferentes detectores foram descritos para análise de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina. Os dados de cada método encontram-se sumarizados no Quadro 2. Como pode ser verificado, apesar da alta seletividade das técnicas utilizadas, nenhum dos métodos disponíveis monitoram simultaneamente a levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina.

QUADRO 2: MÉTODOS ANALÍTICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA O MONITORAMENTO DE LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA

Analitos	Matriz	Técnica de extração	Técnica analítica	Fase móvel	Fluxo da fase móvel (µL /min)	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Referência
Levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: 4 mM de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$, 20 mM H_3PO_4 e MeOH, 75:25, v/v (pH 2,8 ajustado com NaOH)	1000,0	Ultrasphere IP C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	40	TITUS <i>et al.</i> , 1990
Entacapona	Plasma humano	LL	CLAE-E	Isocrática: metanol: THF: Tampão 50 mM NaH_2PO_4 , 20 mM ácido cítrico e 0,25 mM EDTA (pH 2,0 ajustado com AFO); 50:5:63 v/v/v	1500,0	Lichrosorb C18 (250 x 4,0 mm; 10 µm)	35	KARLSSON; WIKBERG, 1992
Levodopa, 3-O-metildopa e dopamina	Plasma humano e de rato	PP	CLAE-E	Isocrática: Tampão fosfato (3,5 mM ácido 1-heptanossulfônico e 0,05 mM EDTA), MeOH e ACN, 88:8:4, v/v/v	1000,0	Spherisorb C-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	NC	RONDELLI <i>et al.</i> , 1994
Levodopa e 3-O-metildopa	Plasma	PP	CLAE-E	Isocrática: 50 mM KH_2PO_4 , 0,7 mM $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$ e 0,3 mM EDTA contendo 12% ACN	1200,0	Ultrasphere XL ODS (70 x 4,6 mm; 3 µm)	Ambiente	BLANDINI <i>et al.</i> , 1997
Tolcapona	Plasma humano	PP	CLAE-UV	Isocrática: Metanol (com 1,5 g de N-hexil-metilamina/litro) e 0,05 M NaH_2PO_4 , 550:450, v/v (pH 2,1 ajustado com AFO). Adiciona 50 mL THF	1000,0	Hipersil ODS (125 x 4,0 mm; 5 µm)	NC	HEIZMANN <i>et al.</i> , 1999
Levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: 16,5 g NaH_2PO_4 , 980 mL água, 1 mL 0,1 M EDTA, 20 mL MeOH e 1,2 mL heptanossulfonato de sódio (pH 3,4 ajustado com H_3PO_4)	1000,0	Lichrosorb C8 (125 x 4,0 mm; 5 µm) e Ultrasphere (250 x 4,0 mm; 5 µm)	Ambiente	SAGAR; SMYTH, 2000
Levodopa	Plasma de saguí	PP	CLAE-E	Isocrática: Tampão 0,1 M NaH_2PO_4 (pH 2,5 ajustado com AFO) e 550 mg/L octilsulfato de sódio, contendo 15% MeOH	230,0	SC-5 ODS (150 x 2,1 mm)	NC	ZHANG; SULZER, 2003

QUADRO 2: continuação

Analitos	Matriz	Técnica de extração	Técnica analítica	Fase móvel	Fluxo da fase móvel (µL /min)	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Referência
Levodopa e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Gradiente: 7,8 g H ₂ NaO ₄ P.2H ₂ O, 50 mg CH ₃ (CH ₂) ₆ SO ₃ Na, 50 µL reagente MB (pH 2,6 ajustado com AFO)	NA	HR80T da ESA	50	SAXER <i>et al.</i> , 2004
Levodopa, carbidopa, dopamina e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: Tampão CAT-A-PHASE da ESA com 0,3% ACN, pH 3,23 ajustado com NaOH 2N	700,0	HR-80 (80 x 4,6 mm; 3 µm) (C18)	21	KARIMI <i>et al.</i> , 2006
Levodopa, 3-O-metildopa e dopamina	Soro humano	PP	CLAE-UV e CLAE-FLU	Gradiente entre fosfato de potássio 0,02 M (pH 2,5) e MeOH	1000,0	Supercosil LC-18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	NC	MUZZI <i>et al.</i> , 2008
Tolcapona	Urina de rato	PP	CLUE-EM Fonte: ESI positivo e negativo	Gradiente entre água e ACN, ambos contendo 0,1% AFO	600,0	BEH C-18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm)	40	SUN <i>et al.</i> , 2009
(E)-entacapona e (Z)-entacapona	Plasma humano	LL	CLUE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Isocrática: Solução aquosa com 1% AFO e MeOH, 50:50, v/v	1000,0	Gemini C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm)	35	YADAV <i>et al.</i> , 2009
Levodopa e entacapona	Plasma humano	NC	CLAE	NC	NC	NC	NC	NAGAI <i>et al.</i> , 2010
Levodopa	Plasma de rato	PP	CLAE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Gradiente entre H ₂ O (0,1% AFO) e MeOH	300,0	Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	20	BUCK; VOEHRINGER; FERGER, 2010
Levodopa	Plasma de rato	PP	CLAE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Gradiente entre ACN e 10 mM acetato de amônio contendo 0,1% AFO	250,0	Xterra C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm)	30	JIANG <i>et al.</i> , 2010
Levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa	Soro humano	PP	CLAE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Isocrática: MeOH: solução aquosa contendo 0,5% AFO, 30:70; v/v	200,0	YMC PACK MB-ODS (150 x 2,1 mm; 3 µm)	NC	PAN <i>et al.</i> , 2010
Levodopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: Tampão fosfato 0,025 M K ₂ HPO ₄ , 0,005 M citrato de sódio, 0,0001 M EDTA e 2,5 mM CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂ SO ₃ Na pH 2,9 e MeOH, 9:1, v/v	1500,0	Phenomenex Luna (150 x 4,6 mm; 5 µm)	NC	KELLER <i>et al.</i> , 2011

QUADRO 2: continuação

Analitos	Matriz	Técnica de extração	Técnica analítica	Fase móvel	Fluxo da fase móvel (µL /min)	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Referência
Levodopa e carbidopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: tampão fosfato 0,1 mM NaH ₂ PO ₄ : (pH 2,5) contendo 5,7% de metanol	1000,0	Inertsil ODS-3	NC	NAGAYAMA <i>et al.</i> , 2011
Levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-E	Isocrática: MeOH e tampão fosfato (1,45 g/L K ₂ HPO ₄ , 18 mg/L EDTA, 98 mg/L CH ₃ (CH ₂) ₇ SO ₃ Na.H ₂ O, 98 mg/L KCl, pH 2,88 ajustado com AFO), 8:92, v/v	1500,0	Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	25	BUGAMELLI <i>et al.</i> , 2011
Entacapona	Plasma humano	SPE	CLAE-E	Isocrática: MeOH, ACN e tampão fosfato (18 mM CH ₃ (CH ₂) ₇ SO ₃ Na.H ₂ O, pH 1,9), 17,5:22,5:60, v/v/v e 0,25% trietilamina	1300,0	Phenomenex C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	25	BUGAMELLI <i>et al.</i> , 2011
Levodopa e dopamina	Cérebro de rato	PP	CLUE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Gradiente entre MeOH e solução aquosa contendo 0,05% AFO e 1 mM ácido heptafluorobutírico	200,0	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm)	NC	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2011
Dopamina	Cérebro de rato	PP	CLUE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Gradiente entre H ₂ O e ACN, ambos contendo 0,1% AFO	200,0	ACE C18 (100 x 2,1 mm; 3 µm)	25	ZHU <i>et al.</i> , 2011
Levodopa, carbidopa e metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Isocrática: Solução aquosa com 0,2% AFO e ACN, 90:10, v/v	200,0	ACE C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm)	18	CÉSAR <i>et al.</i> , 2011a
Levodopa, carbidopa e 3-O-metildopa	Plasma humano	PP	CLAE-EM/EM. Fonte: ESI positivo	Isocrática: Solução aquosa com 0,2% AFO e ACN, 96:4, v/v	200,0	ACE C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm)	18	CÉSAR <i>et al.</i> , 2011b
Levodopa, carbidopa e entacapona	Solução	N/A	CLAE-UV	Gradiente entre MeOH e H ₂ O contendo 20 mM TFA (pH 2,0 ajustado com NaOH)	1000,0	Zorbax Extend C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	30	VEMIC <i>et al.</i> , 2013

Dados: ACN, acetonitrila; AFO, ácido fórmico; CH₃(CH₂)₆CH₂SO₃Na, sal de sódio ácido 1-octanosulfônico; CH₃(CH₂)₆SO₃H, ácido 1-heptanosulfônico; CH₃(CH₂)₆SO₃Na, sal de sódio ácido 1-heptanosulfônico; CH₃(CH₂)₇SO₃Na.H₂O, sal de sódio ácido 1-octanosulfônico mono-hidratado; C₁₂H₂₅SO₃Na, dodecilsulfato de sódio; CLAE-E, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica; CLAE-EM/EM, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; CLAE-FLU, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência; CLAE-UV, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; CLUE-EM, cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas; CLUE-EM/EM, cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; ESI, *electrospray ionization* (ionização por *electrospray*); H₂NaO₄P.2H₂O, di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado; KCl, cloreto de potássio; KH₂PO₄, dihidrogeno fosfato de potássio; K₂HPO₄, hidrogeno fosfato de potássio; LL, extração líquido-líquido; MB, antisséptico; MeOH, metanol; N/A, não se aplica; NaH₂PO₄, fosfato monossódico; NaOH, hidróxido de sódio; NC, não consta; PP, precipitação de proteínas; SPE, extração em fase sólida; TFA, ácido trifluoroacético; THF, tetra-hidrofurano.

2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

2.5.1 Extração por precipitação de proteínas

A precipitação de proteínas é uma técnica simples, rápida, de baixo custo e sua aplicação abrange compostos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Esta técnica é amplamente utilizada como pré-tratamento de amostras de plasma e soro (FLANAGAN *et al.*, 2006; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). O princípio consiste na adição de agentes precipitantes na amostra biológica, seguido de agitação e centrifugação. Por fim, o sobrenadante é analisado (FLANAGAN *et al.*, 2006). Entre os agentes precipitantes encontram-se ácidos, solventes orgânicos, sais e íons metálicos. Esses agentes propiciam uma desnaturação da proteína plasmática e, desta forma, ocorre o rompimento entre a ligação da proteína com o composto de interesse, liberando este último para a fase líquida da mistura, podendo, após um processo de centrifugação, ser analisada (POLSON *et al.*, 2003).

Os solventes orgânicos utilizados como agentes precipitantes diminuem a constante dielétrica entre as proteínas do plasma. Isto gera um aumento de atração entre as moléculas carregadas facilitando as interações eletrostáticas entre as proteínas. Como consequência, ocorre uma agregação entre essas proteínas e sua precipitação (POLSON *et al.*, 2003).

Quando um ácido é utilizado como agente precipitante em uma matriz biológica, como o plasma, deixando o pH do meio abaixo do ponto isoelétrico das proteínas, são formados sais insolúveis com grupos amino carregados positivamente e, dessa forma, precipitam (POLSON *et al.*, 2003).

Altas concentrações de sais adicionadas ao plasma absorvem moléculas de água, diminuindo a disponibilidade desta às proteínas. Gera-se um aumento de interação das regiões hidrofóbicas das proteínas, levando a agregação e precipitação (POLSON *et al.*, 2003).

A carga positiva dos íons metálicos diminui a solubilidade das proteínas plasmáticas por modificar seus pontos isoelétricos. Além disso, os íons metálicos competem com os prótons H^+ por ligações com os aminoácidos das proteínas. Com o aumento de prótons no meio, há uma diminuição do pH. Esse resultado junto com a diminuição da solubilidade promove a precipitação das proteínas plasmáticas (POLSON *et al.*, 2003).

Apesar das vantagens da técnica de extração por precipitação de proteínas, é importante lembrar que o extraído (sobrenadante) contém uma grande quantidade de componentes remanescentes do plasma. Estes, por sua vez, podem diminuir a seletividade do método ou causar supressão do sinal no espectrômetro de massas. A precipitação das proteínas também pode vir acompanhada com a precipitação dos compostos de interesse e, conseqüentemente, com a redução da recuperação dos mesmos (MA *et al.*, 2008). Algumas vezes, é necessário o uso de filtros para melhorar o pré-tratamento do extraído, e isto também diminui a recuperação dos analitos. Embora tenha estas desvantagens, a precipitação de proteínas continua sendo utilizada em ensaios bioanalíticos, pois é a técnica mais simples de extração para este tipo de análise (FLANAGAN *et al.*, 2006).

2.5.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é uma técnica que se baseia no particionamento da amostra entre líquidos de duas fases imiscíveis: uma aquosa e a outra orgânica. Os compostos hidrofílicos da amostra tendem a ir para a fase aquosa enquanto que os compostos hidrofóbicos tendem a ficar na fase orgânica. Caso os compostos de interesse estejam na fase aquosa, eles podem ser analisados diretamente no CLAE. Se estiverem na fase orgânica, podem ser submetidos à evaporação do solvente para posteriormente serem recuperados (WAL *et al.*, 2010).

A vantagem deste método é a sua simplicidade, rapidez e capacidade de recuperação (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; WAL *et al.*, 2010). Como desvantagem é

possível a formação de emulsões que dificultam a extração, o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos e prejudiciais ao ambiente (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

2.5.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de alta seletividade e efetividade na recuperação de analitos a partir de matrizes complexas (BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004; WAL *et al.*, 2010). Essa técnica baseia-se na partição dos compostos de interesse entre uma fase líquida e uma fase estacionária. Esta última fase geralmente é composta de adsorventes à base de sílica, fases quimicamente ligadas à sílica, polímeros e seus derivados (CIOLA, 1998; KATAOKA, 2003). É necessário que os analitos de interesse tenham maior afinidade pela fase estacionária do que a matriz (KATAOKA, 2003). Dessa forma, os compostos de interesse presentes na matriz quando são percolados através de uma fase estacionária, ficam retidos de acordo com o grau de afinidade. A seguir, os interferentes podem ser eluídos ou lavados, diminuindo a presença de compostos indesejados na fração do último extrato que vai ser analisado (WAL *et al.*, 2010).

Uma das vantagens desse tipo de extração é a utilização de pouco solvente orgânico comparado com a extração líquido-líquido e a não formação de emulsões (KATAOKA, 2003; BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004). Porém, essa técnica apresenta desvantagens como o uso de quantidade apropriada de amostra para cada tipo de dispositivo extrator, o alto custo desses dispositivos (que são descartáveis), cuidados com a velocidade de eluição da amostra e uso de aparato adequado (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA), pela Resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012, exige que os métodos bioanalíticos desenvolvidos sejam devidamente validados para garantir que os resultados gerem informações confiáveis sobre a amostra. De acordo com esse órgão, os requisitos mínimos para validação para métodos bioanalíticos são: seletividade, efeito residual, efeito matriz, curva de calibração (linearidade), precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução (BRASIL, 2012).

Seguem abaixo algumas definições para efeito de esclarecimento:

- Limite inferior de quantificação (LIQ): é a menor concentração de um analito na curva de calibração preparada na matriz;
- Limite superior de quantificação (LSQ): é a maior concentração da curva de calibração preparada na matriz;
- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (amostra de CQB): é uma amostra da matriz onde é adicionado analito para ter uma concentração de até três vezes a concentração do LIQ;
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (amostra de CQM): é uma amostra da matriz onde é adicionado analito para ter uma concentração próxima da média entre os limites superior (LSQ) e inferior de quantificação (LIQ);
- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (amostra de CQA): é uma amostra da matriz onde é adicionado analito para ter uma concentração de 75% e 85% do limite superior de quantificação (LSQ);
- Amostra de controle de qualidade de diluição (amostra CQD): é uma amostra da matriz onde é adicionado analito para ter uma concentração acima do LSQ. Esta deve ser analisada por meio de procedimento e proporção de diluição pré-definidos pelo laboratório bioanalítico.

A definição de cada parâmetro de validação, bem como a faixa de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em guias de validação disponíveis na literatura, como por exemplo, o *Guidance for Industry* do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Segue abaixo um breve resumo descrevendo cada parâmetro de validação abordado nesse trabalho.

A) Seletividade: é a capacidade do método de quantificar e diferenciar o analito e o padrão interno na presença de outros componentes da amostra. Em métodos instrumentais de separação a seletividade é a garantia de que os resultados obtidos não são prejudicados pela presença de interferentes da amostra. Se presentes os sinais dos interferentes nos mesmos tempos de retenção do analito e do padrão interno, e estes sejam significativos, o método deve ser alterado visando eliminá-los (BRASIL, 2012);

B) Curva de calibração (linearidade): é a relação da resposta do instrumento com a concentração conhecida do analito. Devem, no mínimo, ser construídas e avaliadas três curvas de calibração. A validação quanto a este parâmetro deve garantir um máximo de precisão e exatidão nos resultados, parâmetros esses monitorados através das amostras de controle de qualidade (CQ). A representação da curva de calibração deve ser por meio de uma equação que deve mostrar a relação da resposta do instrumento com as concentrações conhecidas do analito. A curva de calibração deve ser construída adotando método matemático simples, como o linear (BRASIL, 2012);

C) Precisão: é a obtenção, em uma única fonte de matriz, de resultados próximos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas. Há dois tipos de precisão. A primeira

é a precisão intracorrída (intra-dia), na qual os valores são aferidos em uma mesma corrida. A segunda é a precisão intercorrída (ou inter-dia), que ocorre aferições em corridas diferentes. Esta última deve ocorrer com no mínimo três corridas e cada uma em dias distintos. Para cada corrida deve haver, no mínimo, cinco replicatas que devem abranger no mínimo as cinco concentrações das amostras controle (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) (BRASIL, 2012);

D) Exatidão: é o grau de concordância dos resultados de um ensaio com um valor de referência. Da mesma forma que no ensaio de precisão, a exatidão deve ser avaliada em dois níveis: intracorrída e intercorrída. A primeira é determinada na mesma corrida (intra-dia) e a segunda ocorre em dias diferentes (inter-dia). Na exatidão intercorrídas deve haver no mínimo três corridas diferentes e cada uma em dias distintos (BRASIL, 2012);

E) Efeito residual: é o efeito gerado pelo surgimento ou aumento do sinal do padrão interno ou analito proveniente de contaminação de amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012). Trata-se de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte em função de contaminações;

F) Efeito matriz: a presença dos componentes da matriz biológica podem causar aumento na resposta dos analitos ou padrão interno, supressão de íons, imprecisão dos dados, alteração no tempo de retenção, acréscimo na linha de base, acréscimo ou decréscimo na sensibilidade durante um período de tempo e distorção ou formação de cauda (*tailing*) na saída cromatográfica (YADAV *et al.*, 2009). Esse efeito ocorre com mais frequência quando a ionização é por *eletrospray* (VESSECCHI *et al.*, 2011). Este parâmetro é avaliado através do cálculo do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN, Equação 1, seção 3.8.6) (BRASIL, 2012);

G) Estabilidade: é um ensaio que tem por objetivo determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, sob condições específicas, em uma dada matriz (BRASIL, 2012). O ensaio de estabilidade deve ser realizado para assegurar que a concentração do analito a ser determinada na amostra permaneça estável durante o decorrer do estudo. A instabilidade dos fármacos e seus metabólitos é um dos principais problemas relativos às amostras biológicas, e por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz biológica é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Dessa forma, o ensaio de estabilidade deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras, e não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (BRASIL, 2003; BRASIL, 2012);

H) Recuperação: é a eficiência de um método analítico, expressa como a percentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas a processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (BRASIL, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Foram utilizados para o desenvolvimento, validação e aplicação do método a acetonitrila (ACN) grau CLAE da marca PANREACT (Barcelona, Espanha) e o metanol grau CLAE da Tedia (Fairfield, Ohio, EUA). O ácido fórmico (AFO) (88%) foi adquirido da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda), enquanto que o ácido clorídrico (36,5 – 38,0%) da Mallinckrodt Chemicals (Xalostoc, México). A água ultrapura que foi obtida por meio do Sistema de Purificação Milli-Q[®] A10 (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

3.2 PADRÕES ANALÍTICOS E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

Os padrões de levodopa (98,0%), cloridrato de dopamina (80,8%) e o padrão interno metildopa (99,8%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missúri, EUA). Os padrões de carbidopa mono-hidratada (92,6%), entacapona (99,6%), tolcapona (99,8%) e 3-O-metildopa (87,0%) foram obtidos da *United States Pharmacopoeia* (Rockville, Marilândia, EUA).

3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

Os plasmas hemolisado (plasma contendo hemácias lisadas), lipêmico (plasma pós prandial com alto teor de lipídeos) e normal (plasma não lipêmico e não hemolisado), utilizados para o desenvolvimento e a validação do método, foram

gentilmente cedidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil).

As amostras de plasma dos voluntários foram cedidas pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP, Curitiba, Brasil). Os plasmas foram provenientes de exames de rotina realizados no ambulatório do instituto, ou seja, não foi necessário realizar coleta para a condução do estudo. Os participantes da pesquisa foram pacientes do IPPPP de ambos os sexos, com faixa etária entre 62 e 73 anos. Participaram do estudo pacientes diagnosticados com doença de Parkinson, e submetidos a tratamento com o medicamento Stalevo (Novartis®) nas doses de 100 mg de levodopa, 25 mg de carbidopa e 200 mg de entacapona. Os voluntários receberam informações sobre a utilização do material biológico para condução de nova pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE nº 14078213.1.0000.0102). Os dados dos voluntários participantes deste estudo estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: DADOS DOS VOLUNTÁRIOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Voluntário	Sexo	Idade (anos)
1	M	62
2	M	63
3	F	63
4	M	64
5	M	65
6	F	66
7	M	68
8	F	70
9	F	70
10	F	71
11	M	73
12	F	73
Média ± dp	-	67,42 ± 3,94

Dados: dp, desvio padrão; F: sexo feminino; M: sexo masculino.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoques de levodopa, carbidopa, 3-O-metildopa e metildopa foram preparadas a 1 mg/mL em metanol acidificado com 0,5% de ácido clorídrico. As soluções estoques de entacapona, tolcapona e dopamina foram preparadas na mesma concentração, porém utilizando apenas metanol como solvente. Para completa solubilização, as soluções foram submetidas a banho de ultrassom (Branson 2510, Danbury, EUA) durante 10 min. As soluções de trabalho foram preparadas por meio de diluição apropriada das soluções estoques em acetonitrila, de acordo com a necessidade de cada experimento. As soluções estoque e de trabalho foram mantidas em freezer a -80 °C (Thermo Scientific Revco Plus, Asheville, Carolina do Norte, EUA).

3.5 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B, e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA), que durante as análises foi mantido a temperatura ambiente. Acetonitrila e metanol foram utilizados separadamente como solvente de limpeza no gerenciador de amostras.

O CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o monitoramento em plasma da levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina os seguintes parâmetros foram ajustados:

- Coluna: XBridge C8 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EUA) 150 x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro de partícula;
- Fase móvel: Gradiente entre (A) água contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila:metanol (90:10, v/v) contendo 0,1% ácido fórmico, conforme a Tabela 2.
- Volume de injeção: 20 µL
- Fluxo: 700,0 µL/min
- Temperatura da coluna: 30 °C
- Fonte de ionização: ESI / modo positivo de ionização;

- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): 5500 V, temperatura: 500 °C, gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 8 psi, gás de nebulização (GS1): 45 psi e gás auxiliar (GS2): 45 psi;
- Aquisição dos dados: Monitoramento de reações múltiplas (MRM) com *dwell time* de 400 ms;
- Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: De acordo com o descrito na Tabela 3.

O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, Illinois, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados por meio do software Analyst 1.4.2 (ABI/Sciex).

TABELA 2: GRADIENTE DE FASE MÓVEL UTILIZADO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Tempo (min)	% A	% B
0,0	98	2
2,0	98	2
2,1	10	90
3,5	10	90
3,6	98	2
8,0	98	2

Dados: (A) água contendo 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila:metanol (90:10, v/v) contendo 0,1% ácido fórmico.

TABELA 3: MASSA MOLECULAR DOS ANALITOS, RAZÃO MASSA/CARGA DOS ÍONS MOLECULARES E SEUS RESPECTIVOS ÍONS FRAGMENTOS E PARÂMETROS DE VOLTAGEM PARA QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÃO INTERNO

ANALITO	Massa molecular (Da)	Íon molecular (m/z)*	Transições (m/z)	DP (eV)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
LEVODOPA	197,1879	198,2	198,2 → 152,1**	20,0	7,0	12,0	20,0	4,0
			198,2 → 107,1	20,0	7,0	12,0	35,0	4,0
CARBIDOPA	226,2292	227,2	227,2 → 181,3**	21,0	11,5	14,0	17,0	4,0
			227,2 → 123,1	21,0	11,5	14,0	25,0	4,0
ENTACAPONA	305,2860	306,2	306,2 → 233,1**	45,0	9,0	26,0	25,0	4,0
			306,2 → 159,1	45,0	9,0	26,0	35,0	4,0
TOLCAPONA	273,2408	274,1	274,1 → 182,2**	36,0	10,0	16,0	23,0	4,0
			274,1 → 108,2	36,0	10,0	16,0	57,0	4,0
DOPAMINA	153,1784	154,3	154,3 → 137,2**	16,0	7,5	12,0	15,0	6,0
			154,3 → 91,1	16,0	7,5	12,0	29,0	4,0
3-O-METILDOPA	211,2145	212,2	212,2 → 153,1**	26,0	7,0	12,0	19,0	4,0
			212,2 → 149,1	26,0	7,0	12,0	21,0	4,0
***METILDOPA	211,08	212,2	212,2 → 139,0**	26,0	2,0	14,0	25,0	4,0
			212,2 → 123,0	26,0	2,0	14,0	40,0	4,0

Dados: DP, potencial de desagrupamento; EP, potencial de entrada; CEP, potencial de entrada na cela de colisão; CE, energia de colisão; CXP, potencial de saída da célula de colisão; *[M+H]⁺; **transições utilizadas para quantificação; ***padrão interno.

3.6 TESTES DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS ANALITOS EM ESTUDO EM PLASMA HUMANO

Diferentes agentes precipitantes foram testados com objetivo de avaliar aquele que permitisse uma melhor recuperação dos analitos do plasma. Os solventes utilizados como agentes precipitantes foram: acetonitrila; acetonitrila e água (90:10, v/v); acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico; acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico; acetonitrila:água:ácido fórmico (90:9:1, v/v/v); metanol; metanol contendo 0,1% de ácido fórmico; metanol contendo 1% de ácido fórmico; ácido perclórico 0,6 M; acetonitrila:água:ácido perclórico (90:9:1, v/v/v); metanol contendo 2 M de ácido perclórico; acetonitrila contendo 2 M de ácido perclórico; ácido trifluoracético 2 M; acetonitrila contendo 0,1 % de ácido trifluoracético. A escolha dos agentes precipitantes foi baseada em dados da literatura (TITUS *et al.*, 1990; RONDELLI *et al.*, 1994; BLANDINI *et al.*, 1997; HEIZMANN *et al.*, 1999; ZHANG; SULZER, 2003; SAXER *et al.*, 2004; KARIMI *et al.*, 2006; MUZZI *et al.*, 2008; BUCK; VOEHRINGER; FERGER, 2010; JIANG *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2010; BUGAMELLI *et al.*, 2011; KELLER *et al.*, 2011; CÉSAR *et al.*, 2011a; CÉSAR *et al.*, 2011b).

Para condução dos ensaios, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram transferidas para tubos de *Eppendorf*, e em seguida, fortificadas com 50 µL da solução de trabalho dos analitos, e 50 µL da solução de trabalho do padrão interno, de modo a obter as seguintes concentrações: 150 ng/mL de levodopa, 150 ng/mL de carbidopa, 300 ng/mL de entacapona, 250 ng/mL de tolcapona, 75 ng/mL de 3-O-metildopa, 30 ng/mL de dopamina e 150 ng/mL metildopa (PI). Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 3 min.

Uma alíquota de 700,0 µL de cada agente precipitante foi adicionada ao tubo plástico de *Eppendorf* contendo a amostra de plasma fortificada. A amostra foi agitada em vórtex (3 min) e, em seguida, submetida à centrifugação por 10 min (14000 rpm, 5 °C). O sobrenadante foi injetado diretamente no CLAE-EM/EM. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, sendo definido o melhor procedimento de extração aquele que apresentou a maior recuperação dos analitos com desejada reprodutibilidade.

3.7 PREPARO DA AMOSTRA

As amostras de plasma utilizadas neste estudo foram extraídas através da técnica de precipitação de proteínas. Para tanto, uma alíquota de 700,0 µL de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico foi adicionada a tubos de *Eppendorf* contendo as amostras de plasma. As amostras foram agitadas em vórtex (3 min) e centrifugadas por 10 min (14.000 rpm, 5 °C). O sobrenadante foi injetado diretamente no CLAE-EM/EM.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

A validação do método bioanalítico seguiu os critérios estabelecidos pela resolução ANVISA RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. De acordo com esta resolução os seguintes parâmetros devem ser avaliados: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução (BRASIL, 2012). Além desses parâmetros, foram avaliados o limite de detecção, o limite de quantificação e a recuperação que constam na RDC n. 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

3.8.1 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram estimados por meio da relação sinal-ruído. Para condução desse estudo, amostras de plasma branco foram fortificadas com soluções dos analitos de modo a obter 100 ng/mL de cada composto. As amostras foram diluídas sucessivamente em plasma, extraídas (ver seção 3.7) e analisadas até que o menor sinal (pico cromatográfico) de cada

composto fosse detectado. O LD foi estimado por meio da relação sinal/ruído de 3:1 enquanto que o LIQ foi estimado pela relação sinal:ruído de pelo menos 10:1, até que desejada precisão entre as réplicas fosse alcançada.

3.8.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada pelo método da comparação da matriz. Para a realização deste ensaio, alíquotas de 100 µL de acetonitrila foram adicionadas a tubos de *Eppendorf* contendo, separadamente, uma amostra de 200 µL de plasma hemolisado, uma amostra de 200 µL de plasma lipêmico e quatro amostras de 200 µL de plasma normal (todas obtidas de fontes distintas). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 3 min e submetidas a extração conforme descrito no item 3.7.

Em uma segunda etapa, alíquotas de 200 µL de plasma normal foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter as seguintes concentrações: 20 ng/mL de levodopa, 30 ng/mL de carbidopa, 10 ng/mL de entacapona, 10 ng/mL de tolcapona, 10 ng/mL de 3-O-metildopa, 5 ng/mL de dopamina e 150 ng/mL metildopa (PI). As amostras fortificadas foram homogeneizadas em vórtex por 3 min e, em seguida, os analitos foram extraídos (item 3.7).

Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram sobrepostos aos cromatogramas obtidos com o plasma fortificado. Os valores dos picos interferentes obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram avaliados, devendo ser inferiores a 20% da resposta dos analitos nas amostras fortificadas e inferiores a 5% da resposta do padrão interno (BRASIL, 2012).

3.8.3 Curva de calibração (linearidade)

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada durante três dias distintos por meio do método da padronização interna. Para o preparo das curvas de calibração,

alíquotas de 200 µL de plasma normal foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter sete níveis de concentração em triplicata (Tabela 4). Após a fortificação das amostras, os analitos foram extraídos, conforme descrito na Seção 3.7.

Para cada composto uma curva de calibração foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos/áreas dos picos dos padrões internos *versus* a concentração dos analitos/concentração dos padrões internos. O modelo matemático para gerar a curva foi o método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear $1/x$ ou $1/x^2$. O ângulo, o intercepto e coeficiente de correlação linear (r) foram calculados como parâmetros da regressão. Além disso, para cada composto, em cada nível de concentração, foram calculados o coeficiente de variação (CV%) e o erro relativo (ER%), com a finalidade de monitorar os ajustes de precisão e a exatidão dos pontos da curva. Como critérios de aprovação, para cada nível de concentração, as variações de precisão e exatidão não devem exceder 15%, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012) Além disso, o coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003).

TABELA 4: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Analitos	Nível 1 (ng/mL)	Nível 2 (ng/mL)	Nível 3 (ng/mL)	Nível 4 (ng/mL)	Nível 5 (ng/mL)	Nível 6 (ng/mL)	Nível 7 (ng/mL)
Levodopa	20	50	100	250	500	750	1000
Carbidopa	30	60	80	100	200	400	600
Entacapona	10	20	30	50	100	300	750
Tolcapona	10	20	30	50	100	300	500
3-O-metildopa	10	25	50	100	250	500	1000
Dopamina	5	10	25	50	100	250	500
Metildopa*	150	150	150	150	150	150	150

Dados: *padrão interno.

3.8.4 Amostras de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) do limite inferior de quantificação (LIQ), e as de baixa (CQB), média (CQM) e alta concentração (CQA) foram preparadas de maneira similar às amostras da curva de calibração (Tabela 4), porém em cinco réplicas, de acordo com as concentrações descritas na Tabela 5. O critério de aceitação das amostras de CQ é determinado pela obtenção de ao menos 66% dos controles com desvio inferior a 15% comparado ao valor nominal da curva de calibração, exceto para o LIQ onde não devem ser observadas variações maiores que 20% (BRASIL, 2012).

A única amostra de CQ preparada de maneira distinta às amostras da curva de calibração foi a amostra de controle de qualidade de diluição (CQD). Para o preparo da CQD, uma alíquota de 20,0 µL da solução dos analitos foi adicionada em 980,0 µL de plasma de modo a obter uma concentração final de 1200 ng/mL de cada composto. A amostra fortificada foi agitada em vórtex por 10 min e, em seguida, diluída 1:10, v/v, com plasma normal. A amostra diluída foi novamente agitada (vórtex, 5 min) e, em seguida, separada em alíquotas de 200 µL. As alíquotas foram por fim fortificadas com 50 µL de acetonitrila e 50 µL da solução do padrão interno, novamente agitadas (vórtex, 3 min), processadas (item 3.7) e analisadas. Para a CQD não são admitidos variações de precisão e exatidão maiores do que 15%.

TABELA 5: NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Compostos	LIQ (ng/mL)	CQB (ng/mL)	CQM (ng/mL)	CQA (ng/mL)	CQD (ng/mL)
Levodopa	20	50	250	750	120
Carbidopa	30	60	100	400	120
Entacapona	10	20	50	300	120
Tolcapona	10	20	50	300	120
3-O-metildopa	10	25	100	500	120
Dopamina	5	10	50	250	120

Dados: LIQ: limite inferior de quantificação; LSQ: limite superior de quantificação; CQB: amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM: amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA: amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD: amostra de controle de qualidade de diluição.

3.8.5 Efeito residual

O teste do efeito residual foi realizado para verificar um possível arraste dos analitos e padrão interno (PI) gerados por análises anteriores. Para a condução do ensaio, foram realizadas injeções consecutivas de uma amostra de plasma normal, uma amostra de plasma fortificado com os analitos de interesse nos níveis mais altos de concentração da curva de calibração (LSQ) (Tabela 4) e duas amostras de plasma normal. As respostas dos picos interferentes presentes nas duas amostras de plasma normal, injetadas após a amostra fortificada, devem ser inferiores a 20% comparado com as respostas dos analitos nas amostras processadas do LIQ (Tabela 5). Para o PI, as respostas obtidas de picos interferentes com as duas amostras de plasma normal, injetadas após a amostra fortificada, devem ser inferiores a 5% da resposta do próprio PI da amostra fortificada no LSQ (BRASIL, 2012).

3.8.6 Efeito matriz

O efeito matriz avalia se os componentes do plasma interferem na resposta dos analitos e PI. Para realização do teste, primeiramente foram adicionados 700,0 µL de agente precipitante (acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico) em tubos de *Eppendorf* contendo 200 µL de plasma (quatro amostras normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas). As amostras foram agitadas (vórtex, 3 min) e centrifugadas por 10 min (14.000 rpm, 5 °C). Uma alíquota de 450 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de *Eppendorf* o qual recebeu alíquotas de 25 µL de solução dos analitos e 25 µL da solução do PI, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 3.8.4). Para cada nível de concentração, foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 1) das respostas obtidas com os analitos em plasma e em solução, preparadas nos mesmos níveis de concentração. O efeito da matriz não é

significativo quando a variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$FMN = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}} \quad \text{Equação (1)}$$

3.8.7 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas em três dias distintos (intra e inter-dia), através da análise de cinco réplicas de amostras controle (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) preparadas conforme descrito na seção 3.8.4.

A precisão foi expressa por meio do cálculo do coeficiente de variação (CV%, Equação 2) entre as áreas obtidas de cada composto, em um mesmo nível de concentração. A exatidão foi estimada por meio do cálculo do erro padrão relativo (ER%) obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental de cada composto, em cada nível de concentração (Equação 3). As variações de CV% e ER% devem ser inferiores a 15%, exceto para o LIQ, o qual se admite valores iguais ou menores que 20% (BRASIL, 2012).

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação (2)}$$

$$ER\% = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100, \quad \text{Equação (3)}$$

onde C_{exp} é a média da concentração obtida experimentalmente e C_{nom} é a concentração nominal ou real.

3.8.8 Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado a partir de amostras preparadas nos níveis de concentração do CQB e do CQA. Para cada nível de concentração foram preparadas amostras fortificadas antes do processo de extração, conforme item 3.7, e amostras fortificadas depois do processo de extração, conforme item 3.8.6. A recuperação foi estimada em percentagem, por meio da razão entre a resposta da amostra de plasma fortificada antes do processo de extração, em relação à amostra de plasma fortificada após o processo de extração (considerada 100%) (Equação 4). O ensaio foi realizado em sextuplicata.

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{concentração do analito extraído}}{\text{concentração do analito não extraído}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

3.8.9 Estabilidade dos analitos e padrão interno em solução

3.8.9.1 Estabilidade da solução de trabalho em bancada

A estabilidade das soluções de trabalho foi realizada após 4 e 6 horas de armazenamento sobre a bancada (21 °C). Após esses períodos, as soluções foram misturadas e diluídas com acetonitrila (sextuplicata), de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 3.8.4). Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER%, o qual não deve exceder 10% (BRASIL, 2012).

3.8.9.2 Estabilidade das soluções estoque em geladeira

A estabilidade das soluções estoque foi avaliada após períodos de 2 e 7 dias de armazenamento em geladeira (4°C) em frascos âmbar. Decorrido esses períodos, as soluções foram misturadas e diluídas com acetonitrila (sextuplicata), de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 3.8.4). Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado por meio do ER%, o qual não deve exceder 10% (BRASIL, 2012).

3.8.10 Estabilidade dos analitos e padrão interno em plasma humano

3.8.10.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi realizada mantendo os analitos de interesse em contato com a matriz biológica. Para condução do ensaio, seis alíquotas de 200 µL de plasma normal foram fortificadas com 50 µL de uma solução contendo a mistura dos analitos e 50 µL das soluções do padrão interno, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e do CQA (item 3.8.4). Essas amostras foram agitadas em vórtex por 3 minutos e permaneceram sobre a bancada por períodos de 4 e 6 horas a 21 °C. Após o tempo decorrido, as amostras foram processadas e analisadas (item 3.7). Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado empregando o ER%, o qual não deve exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.8.10.2 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi realizada da mesma forma que a estabilidade de curta duração (item 3.8.10.1). No entanto, após o processamento, as amostras permaneceram no gerenciador de amostras do CLAE-EM/EM por períodos de 4, 6 e 12 horas (5 °C). Decorrido esses períodos, as amostras foram analisadas. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas foram comparados com a média dos valores das amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado empregando o ER%, o qual não deve exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.8.10.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade dos analitos também foi determinada em matriz biológica após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O ensaio foi conduzido utilizando seis (06) alíquotas de 200 µL de plasma normal fortificadas com 50 µL da solução de trabalho, de modo a obter os mesmos níveis de concentração da estabilidade de curta duração (item 3.8.10.1). As amostras fortificadas foram congeladas por 12 h (-80 °C) e, então, descongeladas a temperatura ambiente (1º ciclo). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas (-80 °C) por mais um período de 12 h e, assim sucessivamente, até completar 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Após cada ciclo de descongelamento, as amostras foram fortificadas com 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter 150,0 ng/mL de metildopa. As amostras foram agitadas em vórtex (3 min) e os analitos extraídos conforme descrito na Seção 3.7. Os resultados obtidos com as amostras do ciclo de congelamento e descongelamento foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras

recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado por meio do ER%, o qual não deve exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.8.10.4 Estabilidade de longa duração

Para a condução da estabilidade de longa duração, alíquotas de 50 µL da solução dos analitos foram adicionadas à tubos de *Eppendorf* contendo 950 µL de plasma normal, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 3.8.4). As amostras fortificadas foram agitadas (vórtex, 10 min) e congeladas a -80 °C por períodos de 5, 10 e 14 dias.

Após cada período, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente (21 °C) e foram aliqüotadas (200 µL) em tubos de *Eppendorf*. Nas alíquotas de plasma foram adicionados 50 µL de acetonitrila e 50 µL da solução do padrão interno, de modo a obter 150 ng/mL de metildopa. As amostras foram agitadas (vórtex, 3 min) e os analitos foram extraídos conforme descrito na Seção 3.7. Os dados obtidos com as amostras do ciclo de longa duração foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado por meio do ER%, o qual não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

3.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS PACIENTES

A fim de avaliar a aplicação do método desenvolvido, as amostras de sangue dos pacientes do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Curitiba, Brasil) foram obtidas para exames de rotina no ambulatório. Estas amostras foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético di-potássico (EDTA-K₂) aproximadamente uma hora após os voluntários receberem o medicamento Stalevo®

(100 mg de levodopa, 25 mg de carbidopa e 200 mg de entacapona). As amostras coletadas foram centrifugadas (4000 rpm, 5 min, temperatura ambiente, Eppendorf 5810-R, Hamburg, Alemanha) e os plasmas foram aliquotados. Uma alíquota de aproximadamente 1,0 mL foi reservada e dividida em 5 alíquotas de 200 μ L. As alíquotas de plasma permaneceram em freezer à -40 °C (Thermo Scientific Revco 40, Asheville, Carolina do Norte, EUA) até o momento das análises.

O preparo das amostras consistiu na fortificação de 200 μ L de plasma dos pacientes com 50 μ L de acetonitrila e 50 μ L da solução do padrão interno, de modo a obter uma concentração final de 150 ng/mL de metildopa. As amostras foram agitadas em vórtex (3 min) e, em seguida, submetidas ao processo de extração (Seção 3.7). O sobrenadante foi injetado diretamente no CLAE-EM/EM, conforme as condições previamente padronizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM

Para o desenvolvimento do método bioanalítico por CLAE-EM/EM foi utilizada uma fonte de ionização por *Electrospray* (ESI) a qual permite ionizar compostos de média a alta polaridade, mesmo na presença de matrizes complexas como o plasma, caso do nosso estudo.

A próxima etapa foi checar o sinal dos analitos (íon molecular). Para tanto, soluções de trabalho contendo 100 ng/mL de cada composto foram preparadas em acetonitrila:água (70:30, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e infundidas diretamente no espectrômetro de massas. Após a identificação do sinal de cada composto, foram ajustadas as concentrações das soluções a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada entre 2×10^5 e 1×10^6 cps, intensidade esta recomendada pelo fabricante do equipamento para otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos via Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM). Ao término da otimização automática via MRM, ficou definido que o modo positivo de ionização foi o mais eficiente para ionizar os compostos de interesse. Isso se deve ao fato de que todos os compostos em estudo são nitrogenados o que favorece a protonação. Foram obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto, conforme exemplificado na Figura 5. O fragmento de maior intensidade foi utilizado para quantificação, enquanto que o segundo maior em intensidade, para qualificação do sinal analítico de cada substância.

A próxima etapa de otimização do espectrômetro de massas foi o ajuste dos parâmetros da fonte de ionização. Esse ajuste foi realizado por meio de análises por injeção em fluxo (FIA), acoplando o CLAE ao espectrômetro de massas, sem o uso de coluna cromatográfica. A fase móvel isocrática consistiu de acetonitrila:água (70:30, v/v), mantendo como aditivo 0,1% de ácido fórmico para favorecer a protonação e melhorar o perfil cromatográfico dos compostos. A fase móvel foi eluída a 700,0 μ L/min. Os parâmetros otimizados nessa etapa foram: gás de interface (CUR): 10 psi, gás de

colisão (CAD): 8 psi, gás de nebulização (GS1): 45 psi, gás auxiliar (GS2): 45 psi, voltagem do capilar (IS): 5500 V e temperatura da fonte: 500 °C.

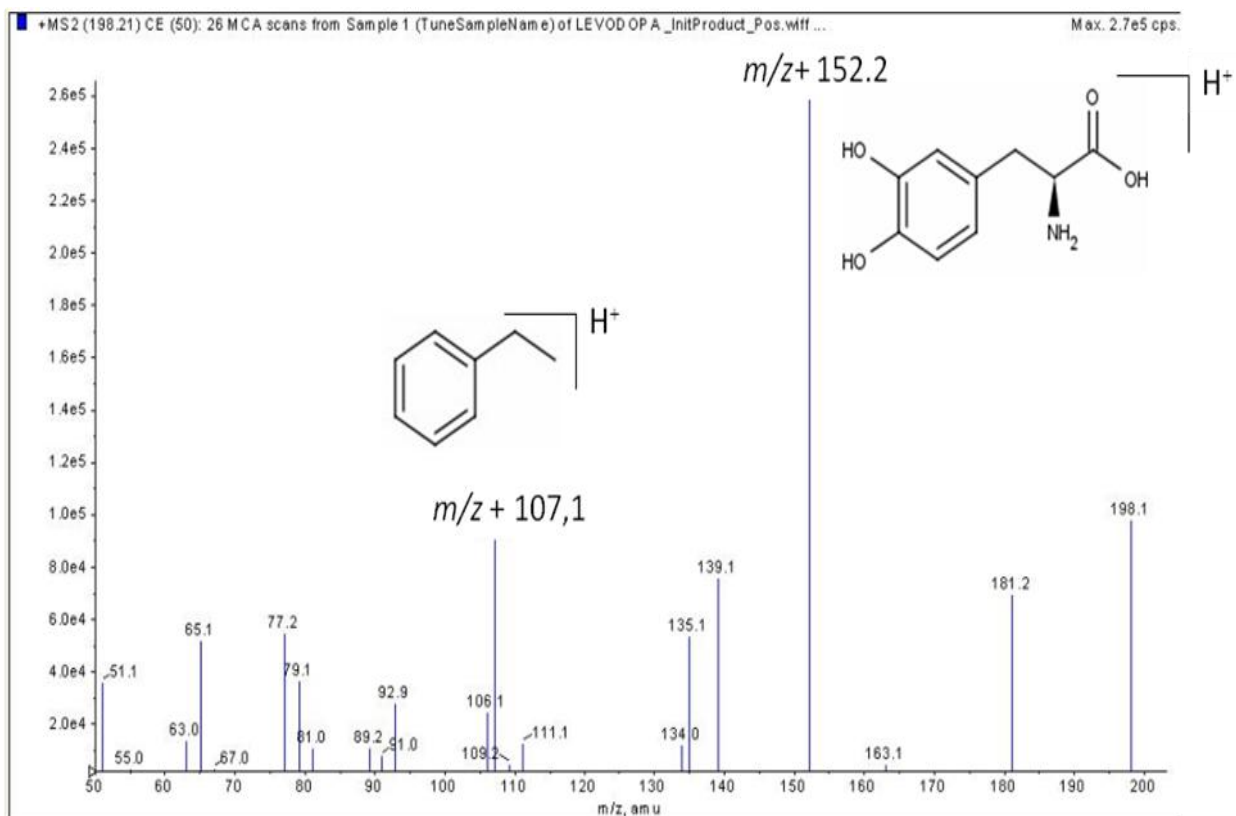


FIGURA 5: ÍONS FRAGMENTOS (m/z) DE MAIOR INTENSIDADE OBTIDOS DA FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DA LEVODOPA (m/z 198,2 Da). Dados: íon fragmento de maior intensidade: $m/z + 152,2$ Da; segundo íon fragmento de maior intensidade: $m/z + 107,1$ Da

Ao término das otimizações do espectrômetro de massas, o método por CLAE-EM/EM foi desenvolvido. As primeiras injeções foram realizadas utilizando coluna XBridge C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) e fase móvel composta de diferentes proporções de metanol e água, mantendo como aditivo 0,1% de ácido fórmico. Após diversas tentativas, não foi possível obter um cromatograma adequado utilizando metanol na fase móvel. Isso porque as linhas de base apresentaram ruídos de alta intensidade, baixa ionização dos analitos e um arraste considerável dos picos cromatográficos da tolcapona e entacapona (dados não mostrados). Na tentativa de melhorarmos a

cromatografia, foi utilizado acetonitrila para compor a fase móvel. Como resultado, houve uma melhora na intensidade do sinal dos analitos, reduzindo o ruído da linha de base e melhorando consideravelmente o perfil dos picos cromatográficos. No entanto, não foi possível obter um cromatograma adequado utilizando a coluna C18, devido à alta polaridade das catecolaminas. Em outras palavras, as catecolaminas eluíram no tempo morto mesmo após exaustivos ajustes na composição da fase móvel, fato que poderia prejudicar a exatidão e a sensibilidade do método devido a zona de supressão iônica.

Com o objetivo de alcançar uma análise por cromatografia adequada, foram testadas colunas de maior polaridade, como por exemplo, colunas empacotadas com grupos fenil e C8 (Zorbax Eclipse XDB-phenyl 150 x 4,6 mm; 5 µm tamanho de partícula e XBridge C8 150 x 4,6 mm; 5 µm de tamanho de partícula). A coluna fenil, a exemplo da coluna C18, não foi eficiente para reter as catecolaminas, fato que foi alcançado somente utilizando a coluna C8.

Os primeiros ensaios conduzidos com a coluna C8 foram realizados utilizando fase móvel eluída em modo isocrático e mantendo a temperatura da coluna em 25 °C. Devido as distintas características de polaridade das substâncias, o uso de fase móvel isocrática não promoveu bons resultados. Assim, utilizando fase móvel de maior polaridade (maior quantidade de água) a corrida cromatográfica tornava-se extensa devido ao maior tempo de retenção da tolcapona e entacapona (substâncias mais apolares). Por outro lado, com fase móvel de menor polaridade (maior proporção de acetonitrila), o tempo de retenção da tolcapona e da entacapona também ficaram reduzidos. No entanto, as catecolaminas eluíam no tempo morto. Portanto, foi necessário desenvolver um gradiente de eluição para o método bioanalítico. Inicialmente o gradiente foi composto de 98% de água e 2% de acetonitrila (700,0 µL/min). Após 2 minutos de corrida a proporção de água foi reduzida para 10% e nestas condições todos os compostos eluíam em menos de 7 minutos. Apesar do curto tempo de corrida, os picos de entacapona e tolcapona permaneceram assimétricos e na tentativa de melhorar o perfil destes picos foram testadas diferentes temperaturas de coluna (25 a 45 °C). Conforme mostrado na Figura 6, o aumento de temperatura de 25 para 30 °C afilou os picos da tolcapona e entacapona promovendo, adicionalmente,

aumento da sensibilidade e simetria dos picos. Entretanto, temperaturas mais altas que 30 °C não mudaram expressivamente o cromatograma e, por isso, a coluna foi mantida a 30 °C. Testes conduzidos com fluxos maiores que 700,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ também não demonstraram benefícios significativos, pois o aumento do fluxo da fase móvel aproximou as catecolaminas do volume morto (Fig. 7).

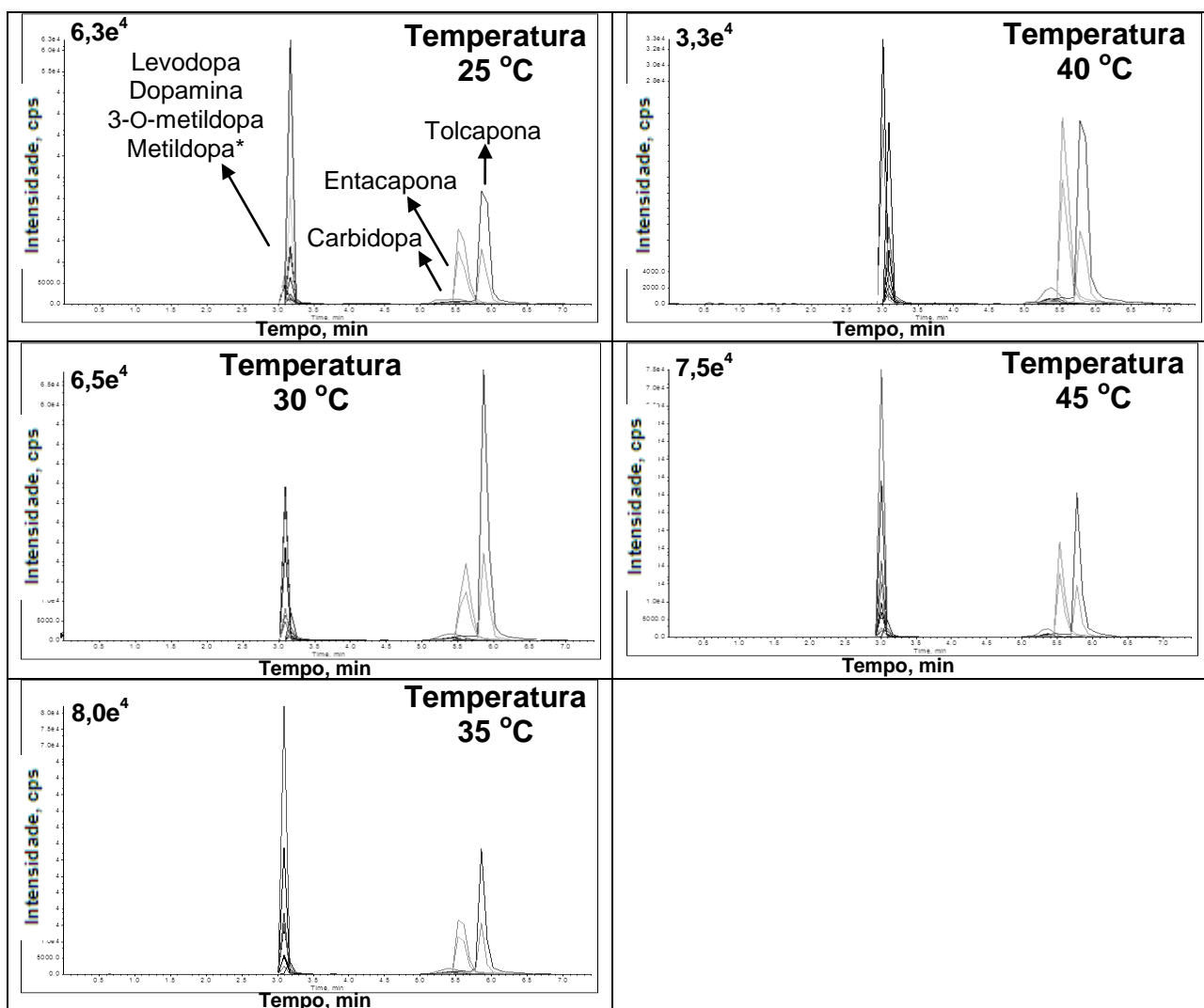


FIGURA 6: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM DE SOLUÇÕES DE ACETONITRILA FORTIFICADAS COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS DE COLUNA. Dados: *padrão interno.

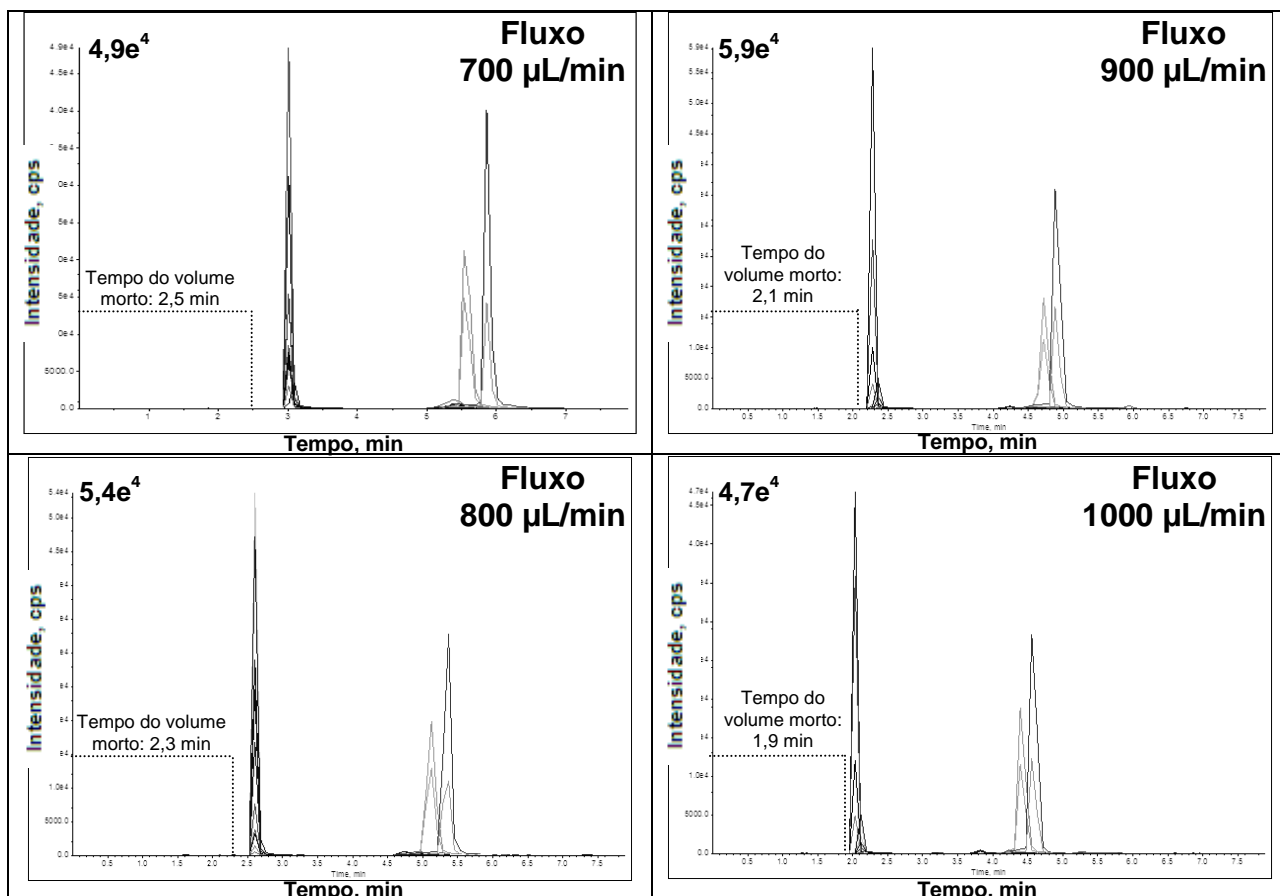


FIGURA 7: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM DE SOLUÇÕES DE ACETONITRILA FORTIFICADAS COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA UTILIZANDO DIFERENTES FLUXOS DA FASE MÓVEL.

Em virtude dos bons resultados, foram iniciados os testes de extração dos analitos em plasma. Porém, já nas primeiras injeções, foi verificado que a matriz biológica promovia arraste da tolcapona e entacapona (resíduo/contaminação proveniente da amostra anterior), problema que só foi resolvido modificando novamente a fase móvel. Como a tolcapona e a entacapona são facilmente solubilizadas em metanol, aos poucos este solvente foi adicionado na fase orgânica (5 a 30%). Ao término dos ensaios, verificou-se que a adição de 10% de metanol na fase orgânica foi suficiente para remover da coluna os resíduos desses fármacos. Além disso, os ensaios demonstraram que a presença de metanol na fase móvel favorece a separação das catecolaminas. Entretanto, proporções maiores do que 10% podem prejudicar o perfil cromatográfico da tolcapona e entacapona.

Ao término do desenvolvimento do método, a melhor condição cromatográfica alcançada para quantificação em plasma da levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina foi por meio do uso de coluna XBridge C8 (150 x 2,1 mm; 5 µm de tamanho de partícula) mantida a 30 °C, volume de injeção de 20 µL, e fase móvel composta de um gradiente entre (A) água e (B) acetonitrila:metanol (90:10, v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico eluída a 700,0 µL/min. O gradiente de eluição utilizado consistiu de: T_{0-2,0min}: A=98%; T_{2,0-2,1min}: A=10%; T_{2,1-3,5min}: A=10%; T_{3,5-3,6min}: A=98%; T_{3,6-8,0min}: A=98%. Os cromatogramas individuais, de cada analito em estudo, obtidos com o novo método estão apresentados na Figura 8:

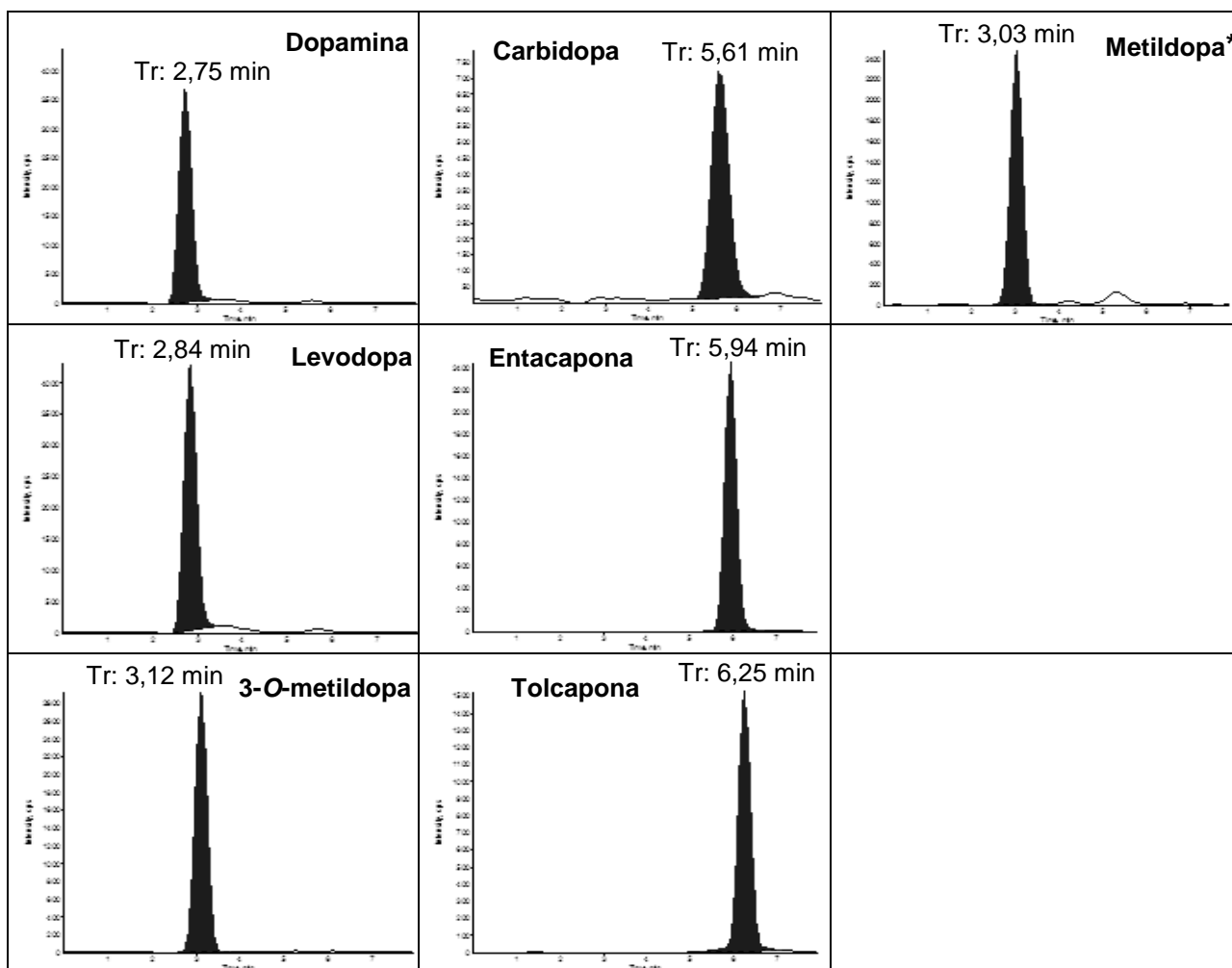


FIGURA 8: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA. Dados: Tr: tempo de retenção; *padrão interno.

Em relação ao método desenvolvido, o mesmo apresentou diferentes vantagens sobre outros descritos na literatura. Um exemplo é a maior sensibilidade e seletividade do espectrômetro de massas comparada com os métodos que utilizam detectores eletroquímico, ultravioleta e fluorescência (TITUS *et al.*, 1990; KARLSSON; WIKBERG, 1992; RONDELLI *et al.*, 1994; BLANDINI *et al.*, 1997; HEIZMANN *et al.*, 1999; SAGAR; SMYTH, 2000; SAXER *et al.*, 2004; KARIMI *et al.*, 2006; MUZZI *et al.*, 2009; BUGAMELLI *et al.*, 2011; KELLER *et al.*, 2011; NAGAYAMA *et al.*, 2011). O novo método também foi considerado ambientalmente correto por utilizar pequenas quantidades de solvente orgânico e corridas analíticas consideravelmente curtas. Além disso, este é o único método totalmente validado capaz de analisar simultaneamente a levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em uma matriz complexa como o plasma humano. Enumerando todos esses aspectos, o método desenvolvido foi considerado adequado para monitorar os níveis plasmáticos dessas substâncias em pacientes com doença de Parkinson.

4.2 EXTRAÇÃO

Com o objetivo de obter a melhor recuperação dos analitos de interesse, diversos testes foram conduzidos utilizando a técnica de extração por precipitação de proteínas. A escolha dos agentes precipitantes foi baseada em dados da literatura, sendo escolhidos para testes: acetonitrila; acetonitrila e água (90:10, v/v); acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico; acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico; acetonitrila:água:ácido fórmico (90:9:1, v/v/v); metanol; metanol contendo 0,1% de ácido fórmico; metanol contendo 1% de ácido fórmico; ácido perclórico 0,6 M; acetonitrila:água:ácido perclórico (90:9:1, v/v/v); metanol contendo 2 M de ácido perclórico; acetonitrila contendo 2 M de ácido perclórico; ácido trifluoracético 2 M; acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoracético.

Dentre as condições testadas, o uso de solução aquosa ácida, exemplo ácido perclórico 0,6 M e ácido trifluoroacético 2 M, não demonstrou eficiência para extrair do

plasma a maioria dos compostos. Quando o metanol foi utilizado como agente precipitante, problemas cromatográficos foram observados (alargamento do picos da tolcapona e entacapona). A melhor recuperação, sem a ocorrência de problemas cromatográficos, só foi alcançada utilizando acetonitrila como agente precipitante (Figura 9). Embora uma maior recuperação para o analito 3-O-metildopa foi obtida utilizando acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico, o uso de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico foi a condição promoveu a melhor recuperação para os demais analitos com desejada reprodutibilidade (desvios < 10%), sendo assim, este último definido como agente precipitante do método.

Devido às diferenças de polaridade entre as substâncias testadas, a extração em fase sólida não foi avaliada. O uso de cartuchos empacotados com grupos mais apolares (C18) favorecem, por exemplo, a retenção da tolcapona e entacapona (substâncias de menor polaridade), mas são ineficientes para reter as catecolaminas (substâncias de maior polaridade). O inverso também é previsto com o uso de cartuchos empacotados com fase normal (por exemplo, cartuchos com empacotamento a base de sílica). Em outras palavras, o uso de cartuchos com maior polaridade proporcionaria uma melhor recuperação da levodopa, carbidopa, 3-O-metildopa, dopamina e metildopa, mas traria prejuízos na recuperação da tolcapona e da entacapona.

A extração líquido-líquido também não foi avaliada, pois esta técnica necessita da evaporação do solvente extrator antes das injeções no CLAE-EM/EM. A evaporação do solvente é alcançada por meio do uso de concentrador de amostras (vácuo e temperatura) ou ainda por meio de fluxo de nitrogênio. Em qualquer caso, a eficiência de extração seria prejudicada, pois é sabido que compostos como levodopa, carbidopa, 3-O-metildopa, dopamina e metildopa são substâncias sensíveis à temperatura e podem degradar ao longo do tempo (RONDELLI *et al.*, 1994; MUNOZ *et al.*, 2009; LEFKOWITZ; HOFFMAN; TAYLOR, 2010). Além disso, estima-se uma baixa recuperação das catecolaminas utilizando extração líquido-líquido, pois essas substâncias são polares e, preferencialmente, permanecerão na porção aquosa do líquido extrator, junto com as proteínas plasmáticas, impossibilitando um pré-tratamento adequado da amostra.

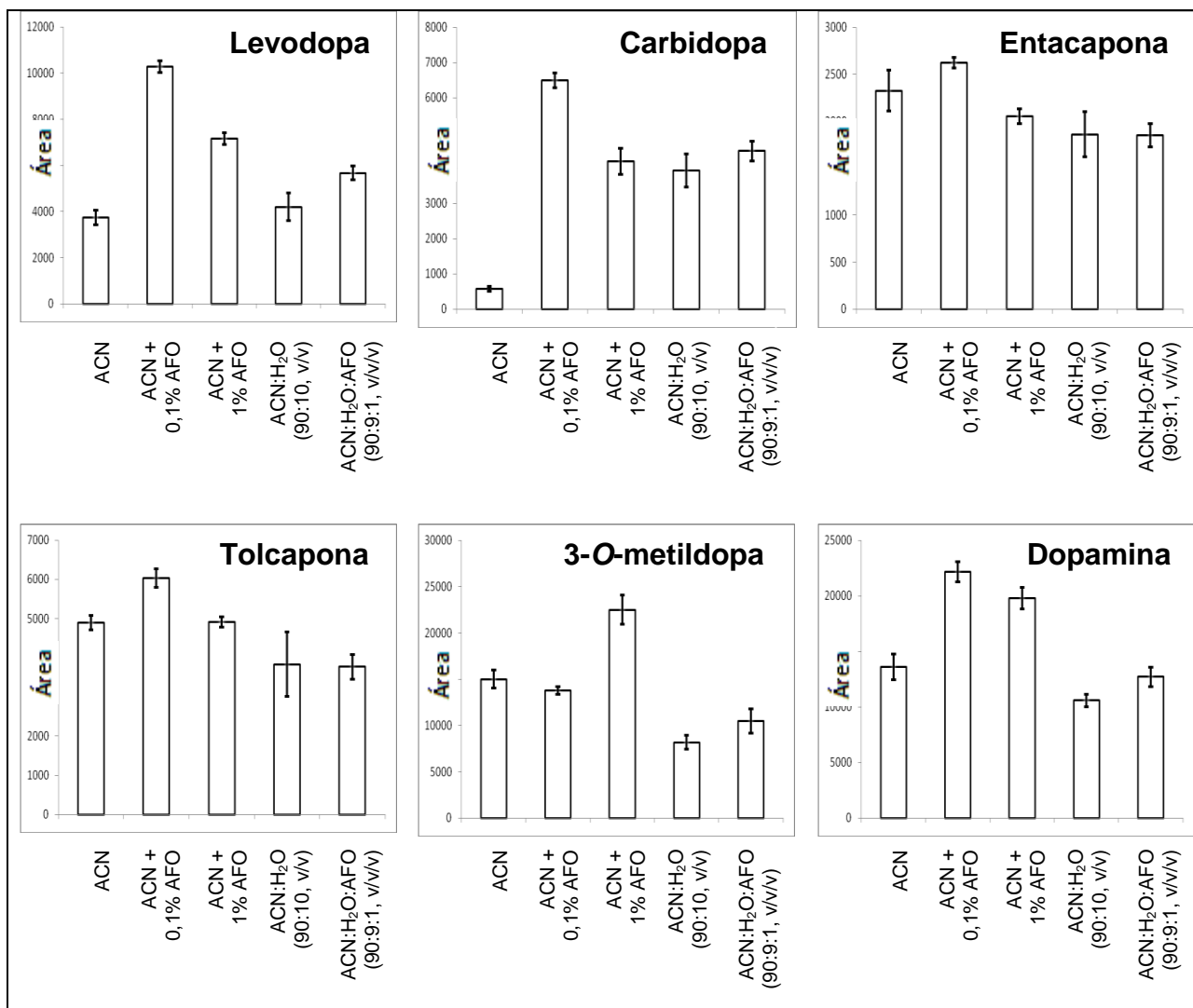


FIGURA 9: RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA EM PLASMA HUMANO OBTIDA POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES. Dados: ACN: acetonitrila; AFO: ácido fosfórico; H₂O: água.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada em plasma normal, lipêmico e hemolisado. De acordo com as Figuras 10 e 11, não houve presença de interferentes endógenos nos mesmos tempos de retenção dos analitos e do padrão interno. Desse modo, o método demonstrou que é seletivo para análise de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa, dopamina e metildopa (PI) em plasma humano.

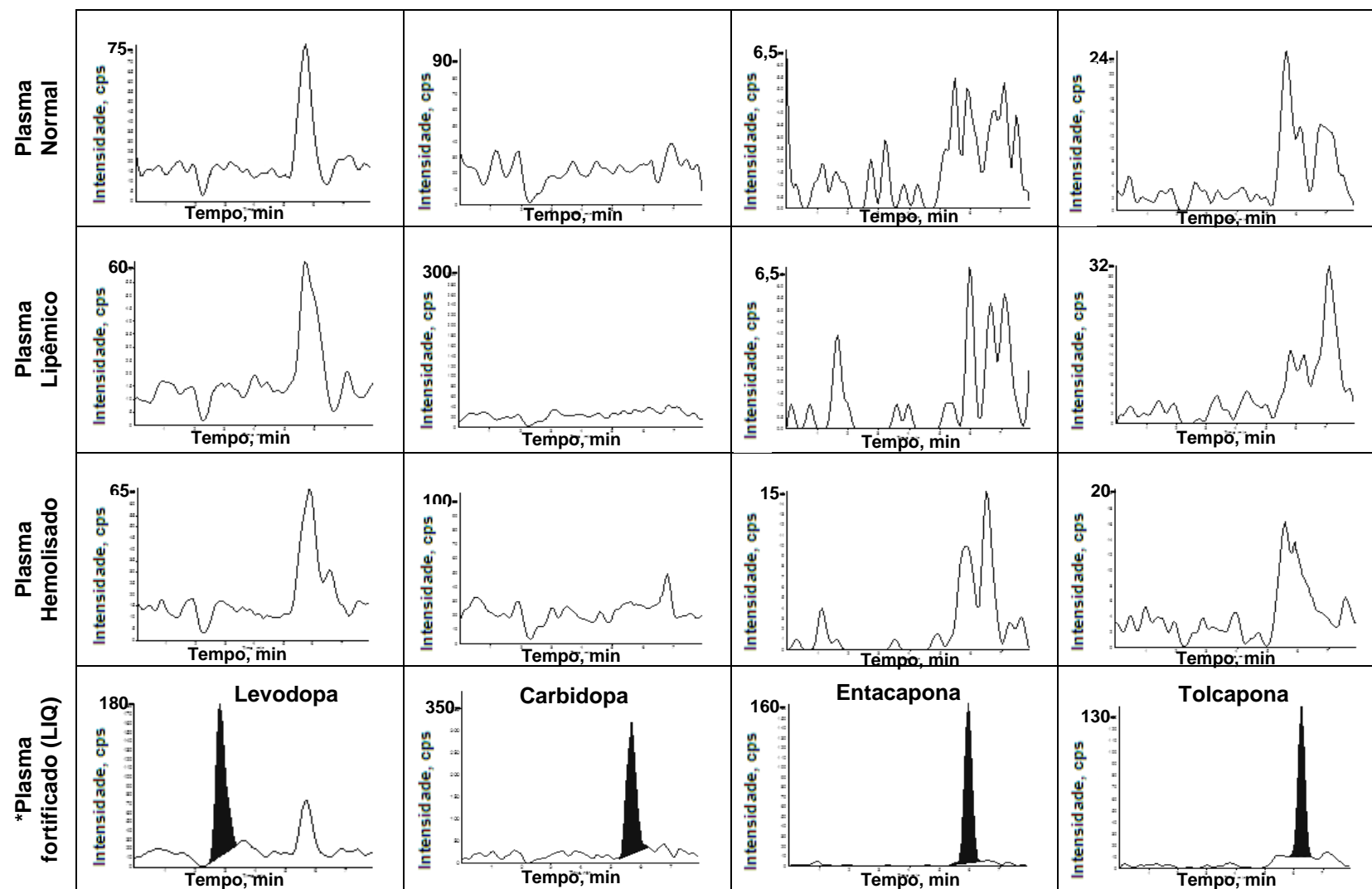


FIGURA 10: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DA LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA. Dados: *plasma normal fortificado com levodopa, carbidopa, entacapona e tolcapona na concentração do LIQ (Seção 3.8.4).

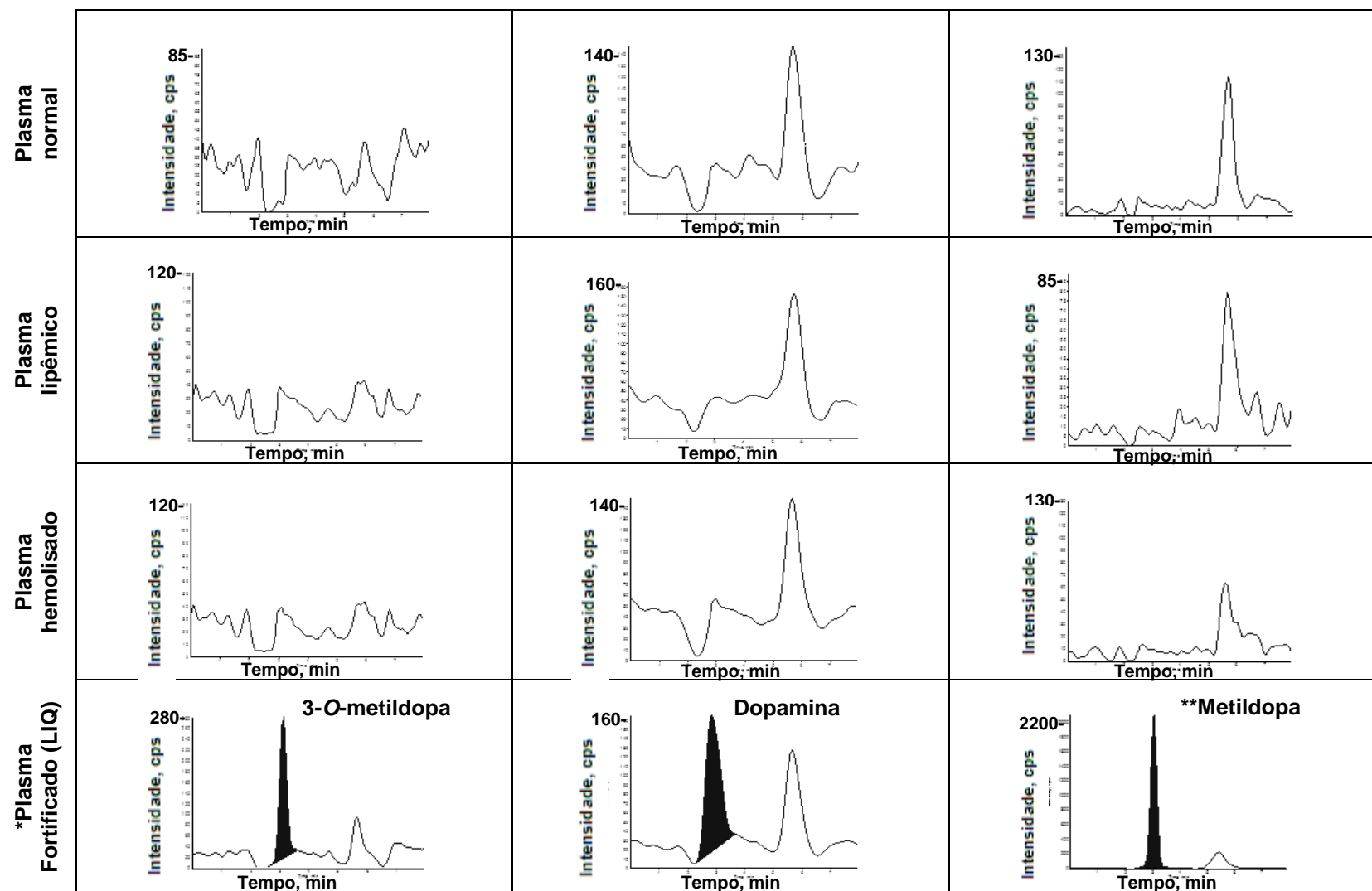


FIGURA 11: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA AVALIAR A SELETIVIDADE DO MÉTODO NAS TRANSIÇÕES MONITORADAS DA 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E PADRÃO INTERNO METILDOPA. Dados: *plasma normal fortificado com 3-O-metildopa e dopamina nas concentrações do LIQ (Seção 3.8.4) e plasma normal fortificado com metildopa na concentração de trabalho (150 ng/mL) ; **padrão interno.

4.3.2 Limite de detecção e quantificação

Conforme demonstrado na Tabela 6, para todos os compostos, os limites de detecção (sinal-ruído > 3) foram inferiores a 7,0 ng/mL. O limite inferior de quantificação baseado na relação sinal-ruído > 10 com desejável precisão (CV < 10%) foi entre 5,0 e 30 ng/mL. Portanto, o método desenvolvido apresentou uma alta sensibilidade.

TABELA 6: LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS EM PLASMA HUMANO

Analitos	Limite de detecção (ng/mL)	Limite de quantificação (ng/mL)
Levodopa	5	20
Carbidopa	7	30
Entacapona	1	10
Tolcapona	1,5	10
3-O-metildopa	2,5	10
Dopamina	1,25	5

4.3.3 Curva de calibração (linearidade)

O método mostrou-se linear para todos os compostos com coeficiente de correlação linear (r) > 0,994 (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17). Para todos os compostos, em cada nível de concentração, as variações de precisão e exatidão foram menores do que 15% (Tabelas 7, 8, 9, 10, 11 e 12) indicando uma resposta confiável do método dentro dos limites de concentração estabelecidos.

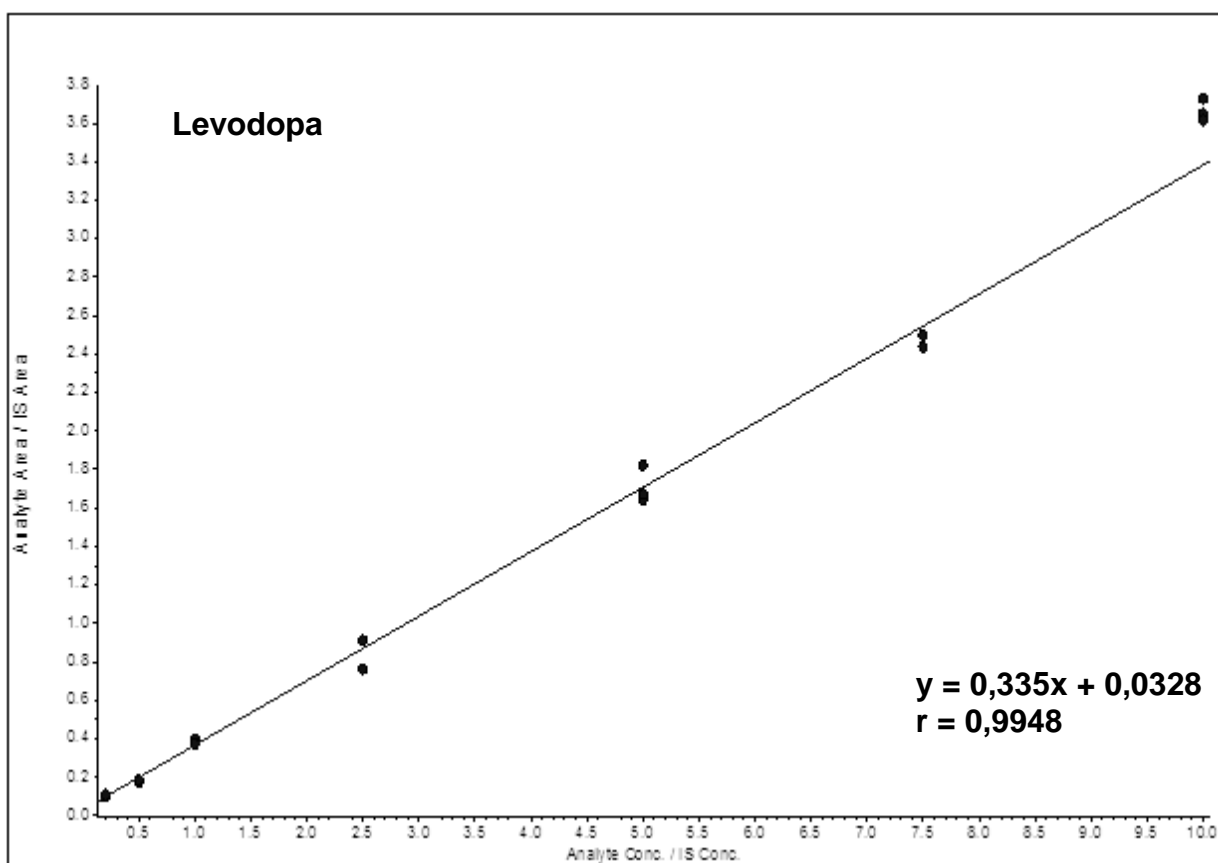


FIGURA 12: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 7: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA LEVODOPA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
Levodopa	20	21,18	1,824	8,61	+ 5,90
	50	44,31	1,575	3,56	- 11,38
	100	105,31	5,017	4,76	+ 5,31
	250	240,12	31,605	13,16	- 3,95
	500	501,09	28,714	5,73	+ 0,22
	750	726,91	12,899	1,77	- 3,08
	1000	1083,73	17,013	1,57	+ 8,37

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

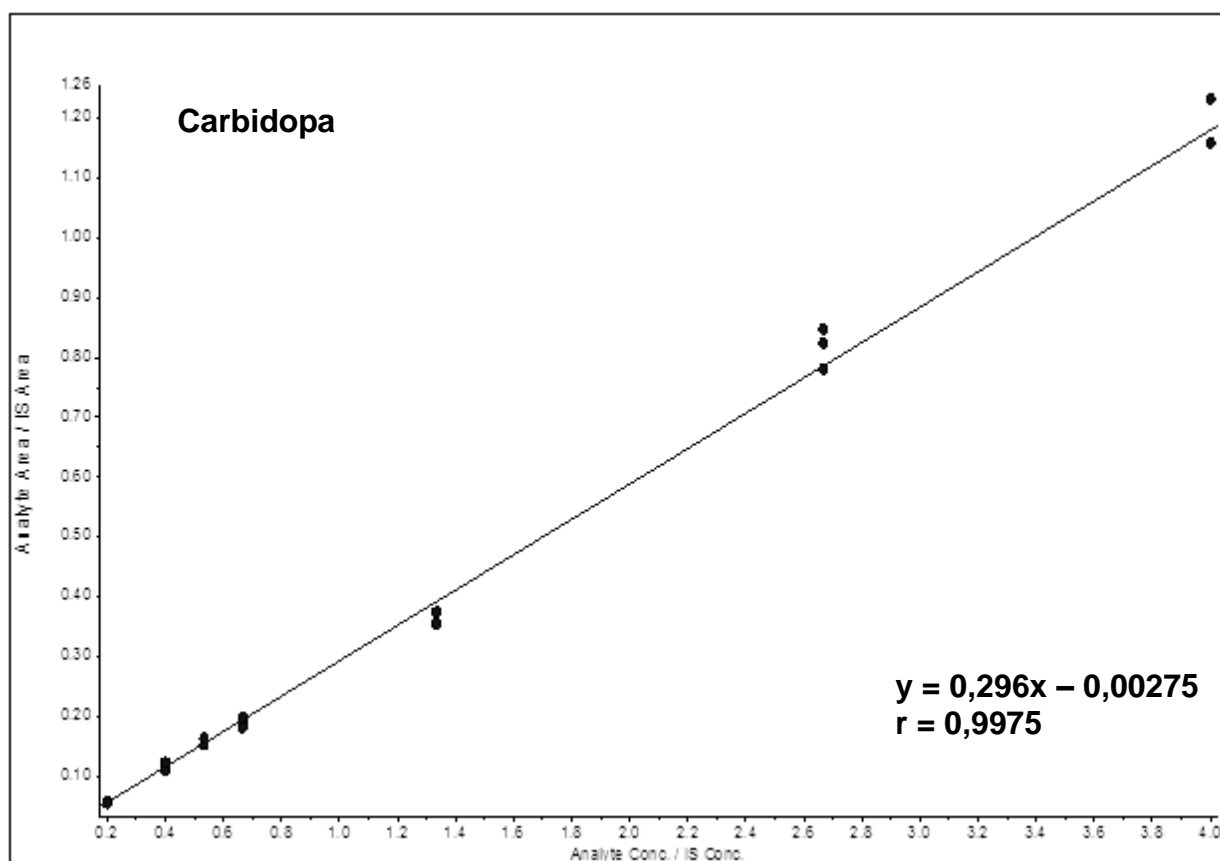


FIGURA 13: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 8: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CARBIDOPA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
Carbidopa	30	30,09	0,714	2,37	+ 0,29
	60	60,40	3,339	5,53	+ 0,66
	80	81,52	3,610	4,43	+ 1,90
	100	97,50	4,420	4,53	- 2,50
	200	186,40	6,993	3,75	- 6,80
	400	415,80	17,250	4,15	+ 3,95
	600	607,88	26,412	4,34	+ 1,31

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

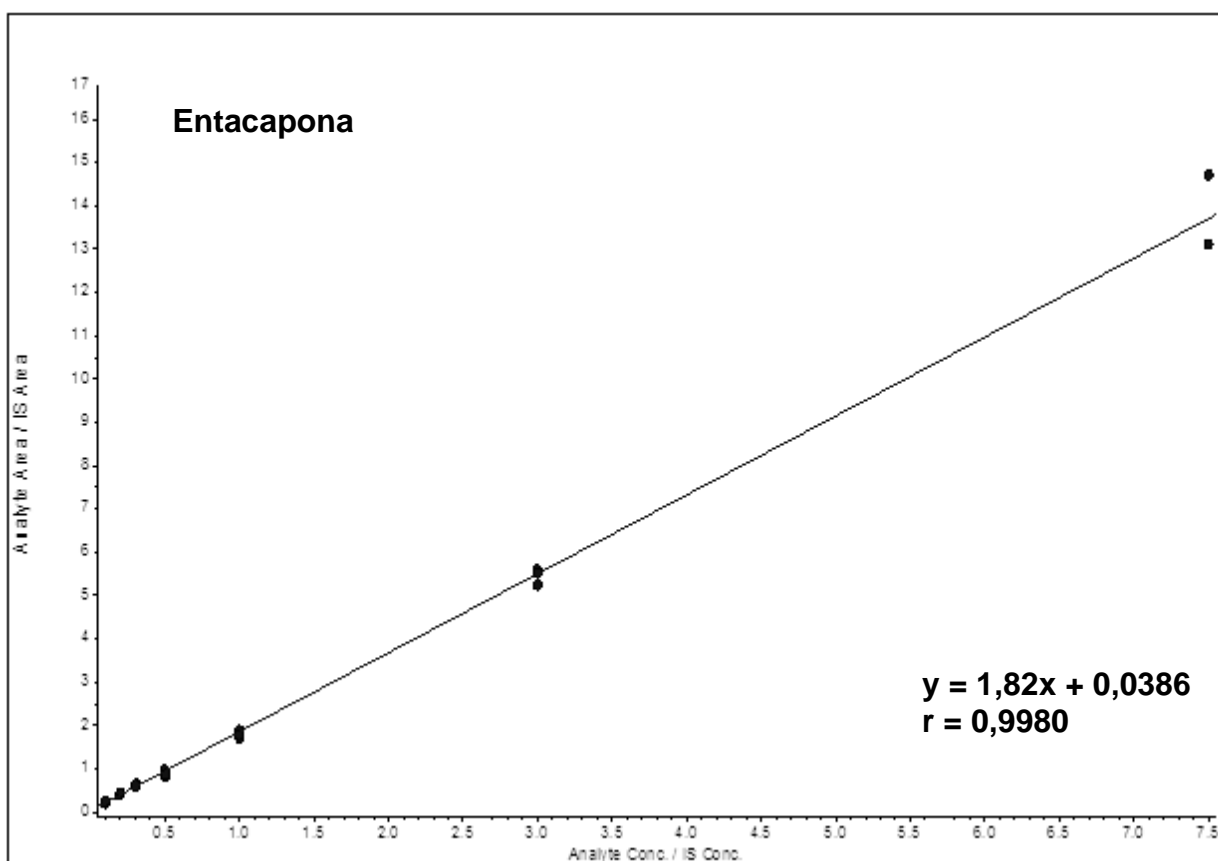


FIGURA 14: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ENTACAPONA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 9: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA ENTACAPONA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
Entacapona	10	10,09	0,922	9,14	+ 0,87
	20	21,33	0,969	4,54	+ 6,65
	30	32,56	2,775	8,52	+ 8,54
	50	46,43	4,078	8,78	- 7,13
	100	96,06	4,648	4,84	- 3,94
	300	297,16	9,838	3,31	- 0,95
	750	761,51	62,388	8,19	+ 1,53

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

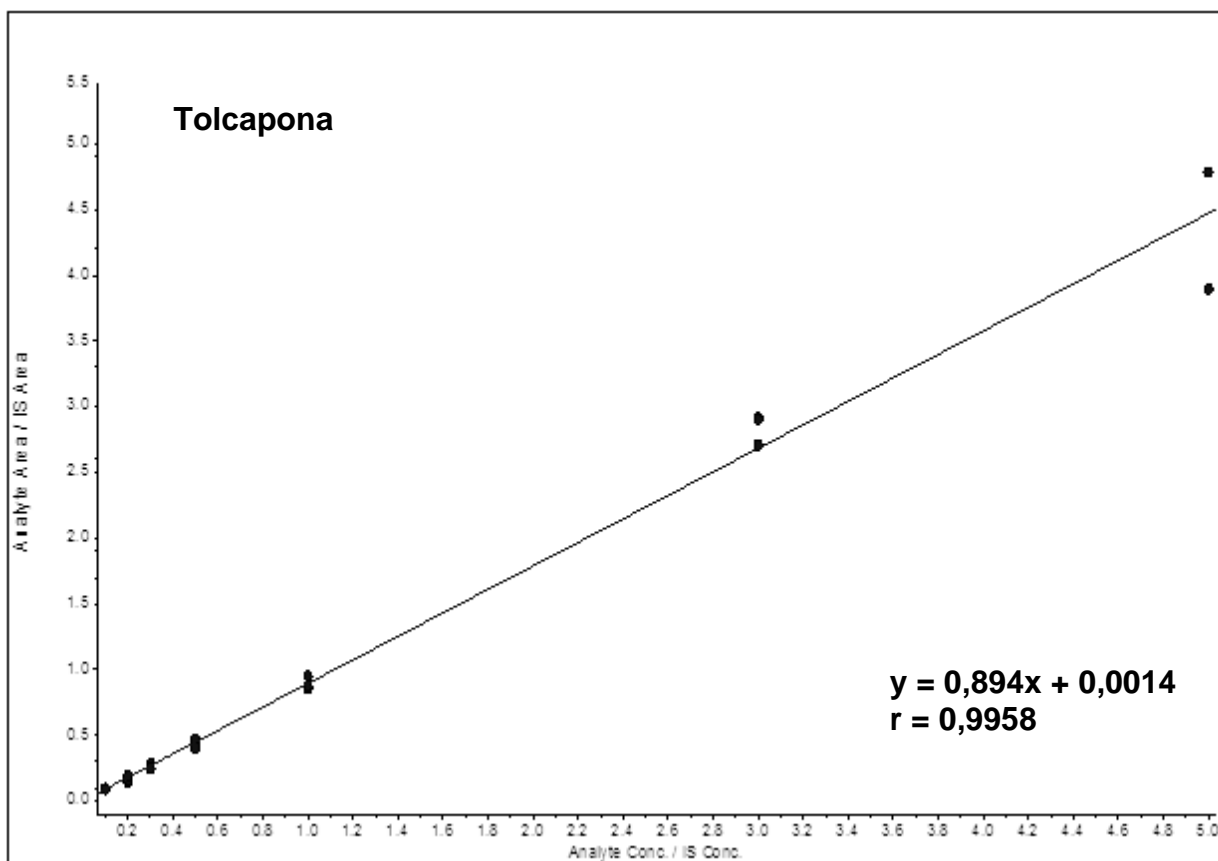


FIGURA 15: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TOLCAPONA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR $1/x^2$. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 10: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA TOLCAPONA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
Tolcapona	10	10,17	0,209	2,06	+ 1,75
	20	19,79	2,321	11,73	- 1,07
	30	29,62	2,721	9,19	- 1,27
	50	48,37	3,417	7,06	- 3,25
	100	99,66	5,655	5,67	- 0,34
	300	317,85	12,988	4,09	+ 5,95
	500	485,29	70,173	14,46	- 2,94

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

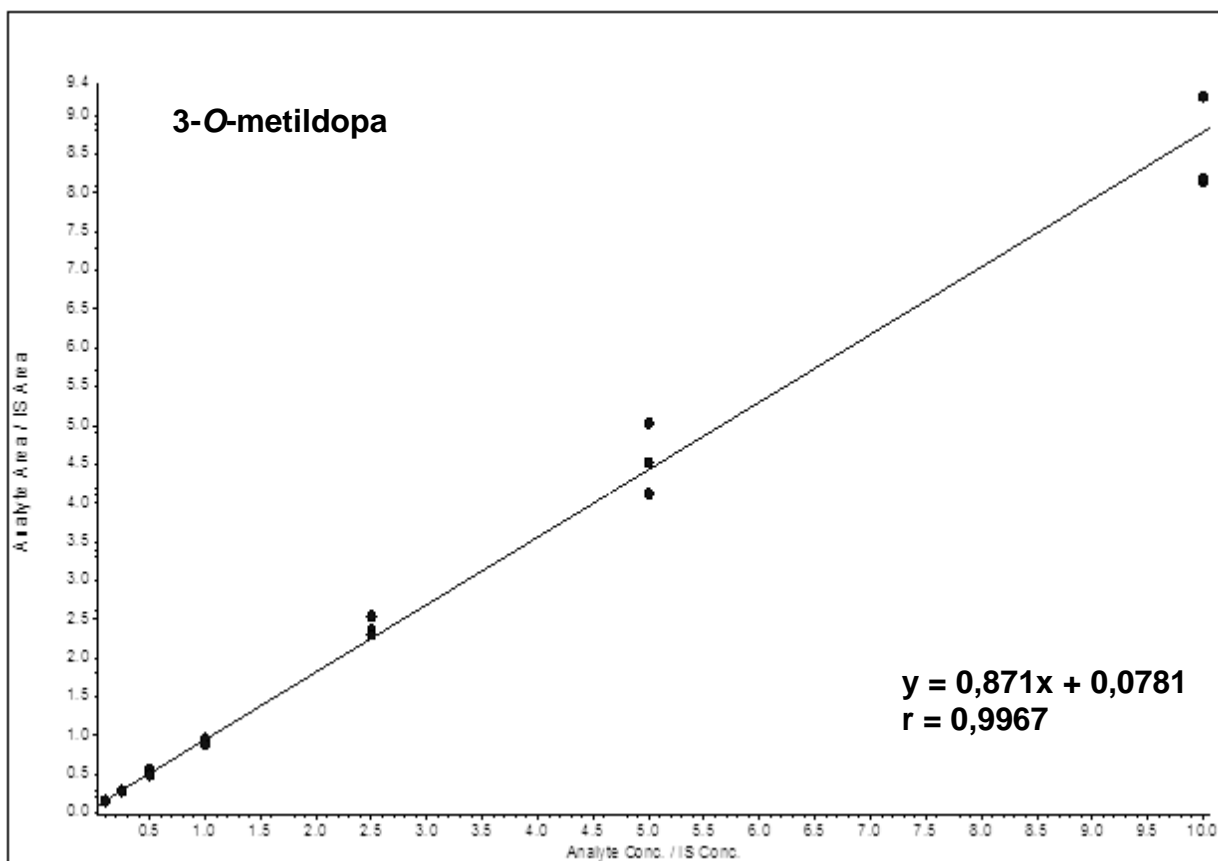


FIGURA 16: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 11: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 3-O-METILDOPA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
3-O-metildopa	10	9,24	0,162	1,75	- 7,60
	25	24,07	0,558	2,32	- 3,72
	50	52,87	4,653	8,80	+ 5,74
	100	96,72	5,456	5,64	- 3,28
	250	266,79	14,418	5,40	+ 6,72
	500	514,15	52,310	10,17	+ 2,83
	1000	969,75	71,223	7,34	- 3,03

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

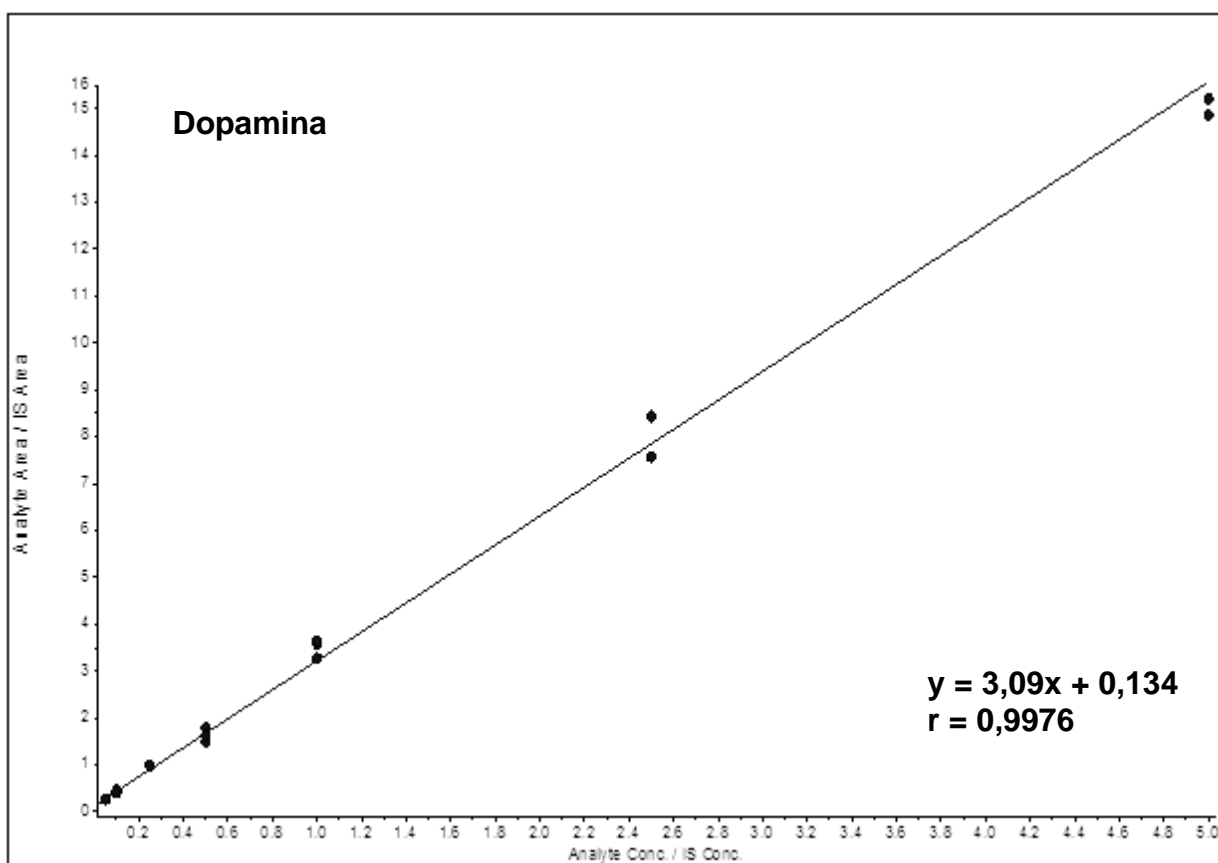


FIGURA 17: CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO LINEAR OBTIDOS POR MEIO DA REGRESSÃO LINEAR 1/x. Da. Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em sete níveis de concentração.

TABELA 12: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DOPAMINA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%)
Dopamina	5	4,30	0,025	0,58	- 13,95
	10	9,75	0,729	7,47	- 2,46
	25	27,50	0,568	2,06	+ 10,01
	50	48,64	4,695	9,65	- 2,72
	100	108,86	6,408	5,89	+ 8,86
	250	254,77	19,712	7,74	+ 1,91
	500	482,54	8,023	1,66	- 3,49

Dados: CV%, Coeficiente de variação; ER%, Erro relativo.

4.3.4 Efeito residual

Os cromatogramas obtidos com plasma branco, após as injeções de amostras de plasma preparadas no nível mais alto de concentração da curva de calibração, estão apresentados nas Figuras 18 e 19. Conforme demonstrado, nenhum pico interferente significativo foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e do padrão interno, não havendo, portanto, risco de contaminação causado pelo arraste dos analitos entre as injeções.

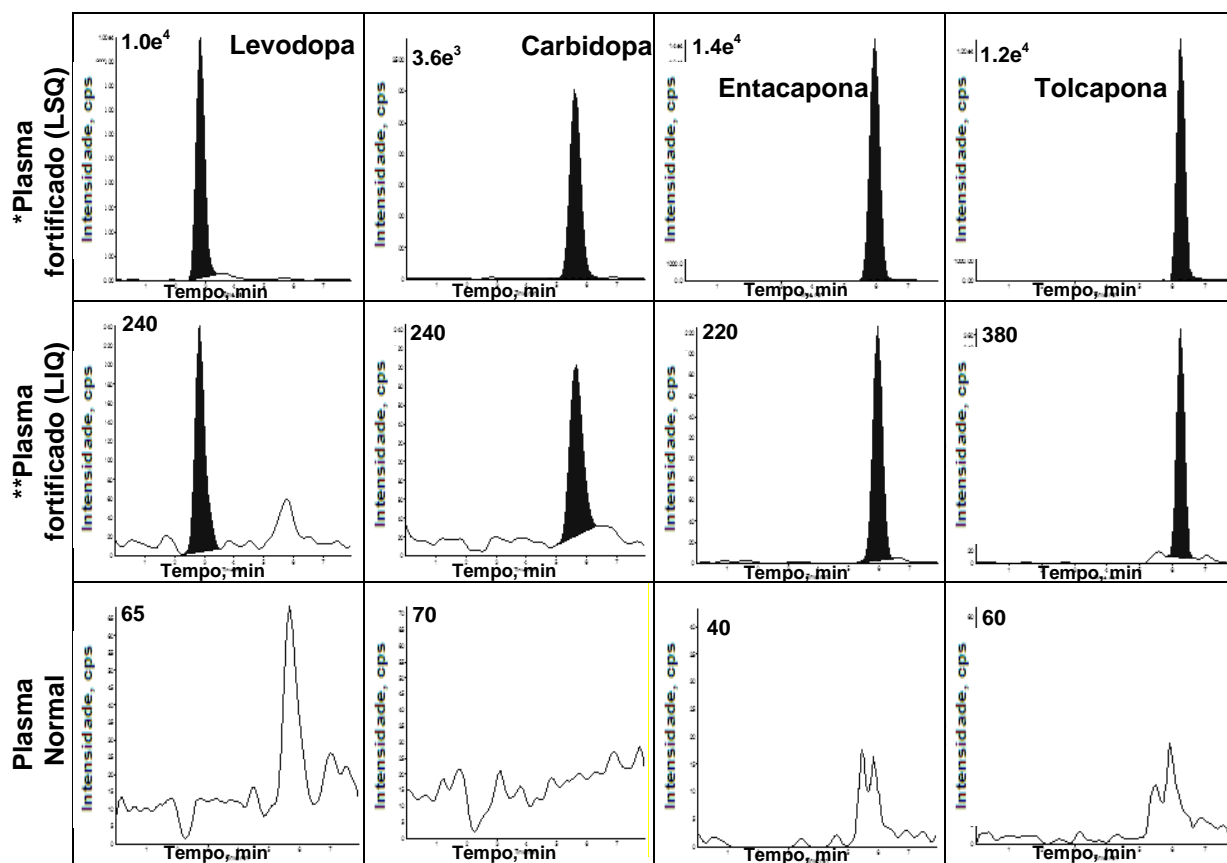


FIGURA 18: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL DA LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA. Dados: *plasma normal fortificado com analitos na concentração do LSQ; **plasma normal fortificado com analitos na concentração do LIQ.

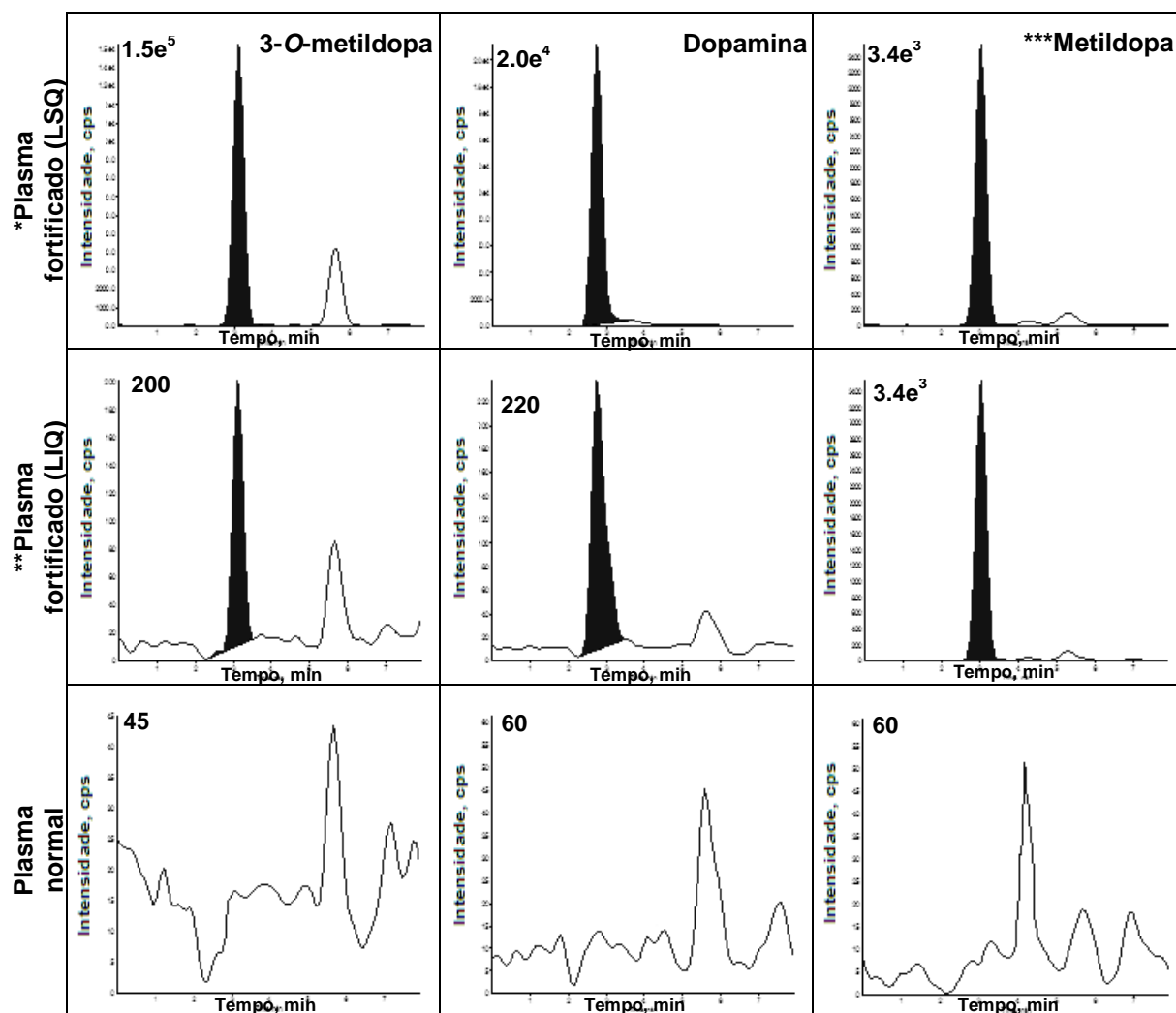


FIGURA 19: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DO EFEITO RESIDUAL DA 3-O-METILDOPA, DOPAMINA E METILDOPA. Dados: *plasma normal fortificado com analitos na concentração do LSQ; **plasma normal fortificado com analitos na concentração do LIQ; ***padrão interno.

4.3.5 Efeito matriz

Os resultados do teste de efeito matriz encontram-se na Tabela 13. Pode-se verificar que o valor do fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) de cada analito encontra-se abaixo de 15% (quinze por cento). Esses resultados mostram que o efeito da matriz biológica nas respostas do analito e do padrão interno não é significativo.

TABELA 13 : VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO POR PADRÃO INTERNO (FMN) DA LEVODOPA, CARBIDOPA, DOPAMINA, ENTACAPONA, TOLCAPONA E 3-O-METILDOPA CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ

Compostos	Nível de concentração (ng/mL)	FMN*	Média dos FMNs \pm dp	CV% (FMN)
Levodopa	50	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	7,97
	750	0,16 \pm 0,03		
Carbidopa	50	0,16 \pm 0,03	0,17 \pm 0,00	2,36
	400	0,17 \pm 0,04		
Dopamina	10	0,46 \pm 0,08	0,44 \pm 0,03	6,47
	250	0,42 \pm 0,08		
Entacapona	10	0,59 \pm 0,05	0,64 \pm 0,07	10,54
	300	0,68 \pm 0,04		
Tolcapona	10	0,48 \pm 0,15	0,47 \pm 0,01	2,91
	300	0,46 \pm 0,09		
3-O-metildopa	25	0,29 \pm 0,06	0,27 \pm 0,02	9,09
	500	0,25 \pm 0,07		

Dados: *FMN, Fator de matriz normalizado por padrão interno calculado de acordo com a Equação 1 (seção 3.8.6)

4.3.6 Precisão e exatidão

Os resultados da precisão e exatidão encontram-se na Tabela 14. Conforme pode ser observado, para todos os níveis de concentração avaliados, as variações de precisão (CV%) e exatidão (ER%) foram menores do que os 15% preconizados pela legislação vigente (BRASIL, 2012). Portanto, este método é considerado preciso e exato.

TABELA 14: RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR MEIO DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE-EM/EM

Compostos	Amostra controle	Concentração nominal (ng/mL)	Exatidão		Precisão	
			Média intra-dia (ER %)	Média inter-dia (ER %)	Média intra-dia (CV %)	Média inter-dia (CV %)
Levodopa	CQ-LIQ	20	-5,04	-1,36	9,13	8,76
	CQB	50	-0,15	-0,05	9,20	7,20
	CQM	250	2,76	-1,10	6,53	4,71
	CQA	750	-0,43	2,73	8,70	9,24
	CQD	120*	-9,73	-0,37	7,45	6,34
Carbidopa	CQ-LIQ	30	-6,30	1,58	2,12	4,76
	CQB	60	9,48	4,22	0,74	3,95
	CQM	100	-0,13	5,30	4,60	5,48
	CQA	400	-1,40	2,37	11,31	7,48
	CQD	120*	-3,74	-3,99	5,46	5,70
Entacapona	CQ-LIQ	10	10,60	8,21	2,64	6,84
	CQB	20	8,93	5,24	4,01	3,86
	CQM	50	-3,12	1,65	6,40	4,92
	CQA	300	-0,36	0,50	3,71	3,25
	CQD	120*	-4,72	-0,02	5,00	4,43
Tolcapona	CQ-LIQ	10	6,00	5,93	6,58	5,66
	CQB	20	8,43	4,73	3,59	4,09
	CQM	50	1,18	0,25	8,36	9,87
	CQA	300	6,80	4,35	6,36	4,77
	CQD	120*	-4,70	-0,54	3,31	5,26
3-O-metildopa	CQ-LIQ	10	-7,80	-3,28	3,87	10,79
	CQB	25	-6,87	-6,52	8,44	7,44
	CQM	100	-5,80	-6,69	6,93	6,65
	CQA	500	-2,43	-5,12	8,47	8,05
	CQD	120*	-0,52	-3,98	9,05	5,77
Dopamina	CQ-LIQ	5	-11,88	-7,73	5,58	4,77
	CQB	10	-8,67	-0,66	5,84	7,36
	CQM	50	-2,24	-1,55	6,62	5,93
	CQA	250	0,28	-1,51	6,94	6,37
	CQD	120*	4,60	4,61	4,16	7,72
Metildopa*	-	150	6,20	-3,58	6,99	7,23

Dados: ER, erro relativo; CV, coeficiente de variação; CQ-LIQ, amostra de controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB, amostra de controle de qualidade de baixa concentração; CQM, amostra de controle de qualidade de média concentração; CQA, amostra de controle de qualidade de alta concentração; CQD, amostra de controle de qualidade de diluição; *padrão interno; **valor nominal após diluição 1/10 em plasma normal.

4.3.7 Teste de recuperação

Os resultados da recuperação dos analitos e do padrão interno utilizando a técnica de extração por precipitação de proteínas encontram-se na Tabela 15. Pode-se observar que para todos os compostos, nos diferentes níveis de concentração, a quantidade recuperada foi maior que 59% com desejada precisão ($CV < 8\%$). Portanto, o uso da acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico como agente precipitante foi considerado eficiente para extrair do plasma a levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa, dopamina e o padrão interno metildopa.

TABELA 15: RECUPERAÇÃO OBTIDA POR MEIO DA EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO

Técnica de extração	Compostos	Concentração adicionada (ng/mL)**	Quantidade recuperada (ng/mL \pm DP)***	Média de recuperação (%)	Precisão da extração (CV%)
Precipitação de proteínas	Levodopa	50	29,58 \pm 0,30	59,15	1,03
		750	451,67 \pm 10,46	60,22	2,32
	Carbidopa	60	38,51 \pm 1,07	64,19	2,79
		400	270,42 \pm 3,77	67,61	1,39
	Entacapona	20	20,88 \pm 0,68	104,41	3,27
		300	308,19 \pm 4,09	102,73	1,33
	Tolcapona	20	20,96 \pm 0,82	104,82	3,89
		300	316 \pm 10,33	105,60	3,26
	3-O-metildopa	25	20,24 \pm 0,95	80,98	4,71
		500	419,54 \pm 32,60	83,91	7,77
	Dopamina	10	9,33 \pm 0,57	93,25	6,12
		250	212,28 \pm 16,76	84,91	7,90
	Metildopa*	150	94,84 \pm 1,70	63,23	1,79

Dados: *padrão interno; **concentração real dos analitos adicionados nas amostras de plasma processadas (100%); ***quantidade dos analitos recuperada do plasma fortificado antes da extração

4.3.8 Estabilidade

Os resultados da estabilidade das substâncias de interesse em solução e em plasma encontram-se nas Tabelas 15 e 16. Nessas tabelas é possível observar que as soluções de trabalho permaneceram estáveis por 4 h na bancada, enquanto que as soluções estoque foram estáveis por 2 dias em geladeira (4 °C). Os analitos também foram estáveis quando permaneceram em contato com a matriz biológica por um período de 4 h na bancada (21 °C) e 6 h no gerenciador de amostras (5 °C). O estudo de estabilidade de longa duração mostrou que as substâncias armazenadas em freezer (-80 °C) não sofrem degradação significativa em 10 dias e não houve comprometimento da estabilidade após três ciclos de congelamento e descongelamento (12 h cada ciclo).

TABELA 16: ESTABILIDADE DA LEVODOPA, ENTACAPONA E TOLCAPONA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)

ESTABILIDADE			Levodopa		Entacapona		Tolcapona		Metildopa
			Nível de concentração 50,0 ng/mL	Nível de concentração 750,0 ng/mL	Nível de concentração 20,0 ng/mL	Nível de concentração 300,0 ng/mL	Nível de concentração 20,0 ng/mL	Nível de concentração 300,0 ng/mL	Nível de concentração 150,0 ng/mL
SOLUÇÃO	4h em bancada (21°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	49,4 ± 6,9	784,1 ± 82,9	19,1 ± 1,3	310,5 ± 11,6	18,8 ± 1,4	301,0 ± 30,2	139,9 ± 13,2
		CV (%)	13,90	10,57	6,89	3,74	7,35	10,03	9,35
		ER (%)	-1,14	+4,54	-4,28	+3,49	-6,16	0,35	-6,73
	2 dias em geladeira (4°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	46,2 ± 4,1	702,2 ± 83,8	19,9 ± 1,9	291,1 ± 8,1	18,9 ± 2,4	292,4 ± 16,0	143,0 ± 6,5
		CV (%)	8,97	11,94	9,47	2,77	12,85	5,47	4,60
		ER (%)	-7,62	-6,37	-0,31	-2,98	-5,50	-2,54	-4,64
PLASMA	Curta duração (4h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	43,6 ± 3,1	693,5 ± 62,0	19,2 ± 0,6	296,2 ± 3,7	20,4 ± 0,8	318,3 ± 23,8	135,7 ± 8,8
		CV (%)	7,18	8,94	3,20	1,26	3,82	7,47	6,47
		ER (%)	-12,81	-7,53	-3,95	-1,28	+1,88	+6,09	-9,56
	Pós-processamento (6h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	52,6 ± 0,5	831,2 ± 25,8	20,8 ± 0,9	338,7 ± 13,2	21,8 ± 1,0	317,6 ± 26,5	143,9 ± 3,6
		CV (%)	0,94	3,11	4,47	3,88	4,36	8,33	2,49
		ER (%)	+5,15	+10,83	+3,79	+12,91	+9,04	+5,88	-4,08
	3 Ciclos de descongelamento (12h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	50,9 ± 2,1	725,3 ± 50,7	21,8 ± 1,0	313,9 ± 25,5	21,5 ± 0,8	315,3 ± 35,5	N/A
		CV (%)	4,12	6,98	4,72	8,14	3,67	11,25	N/A
		ER (%)	+1,70	-3,30	+8,91	+4,65	+7,49	+5,11	N/A
	Longa duração (10 dias)	Recuperação (ng/mL ± dp)	51,8 ± 4,6	715,1 ± 38,5	19,8 ± 2,1	291,3 ± 14,5	19,1 ± 2,5	295,8 ± 14,4	N/A
		CV (%)	8,86	5,39	10,44	4,96	12,88	4,87	N/A
		ER (%)	+3,52	-4,65	-1,06	-2,91	-4,48	-1,40	N/A

Dados: Temperatura do ciclos de descongelamento e longa duração ocorreram à -80°C. dp, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; ER, erro relativo; N/A, não se aplica.

TABELA 17: ESTABILIDADE DA CARBIDOPA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 6)

ESTABILIDADE			Carbidopa		3-O-metildopa		Dopamina	
			Nível de concentração 60,0 ng/mL	Nível de concentração 400,0 ng/mL	Nível de concentração 25,0 ng/mL	Nível de concentração 500,0 ng/mL	Nível de concentração 10,0 ng/mL	Nível de concentração 250,0 ng/mL
SOLUÇÃO	4h em bancada (21°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	55,2 ± 4,0	396,8 ± 10,2	23,5 ± 1,2	485,3 ± 57,4	9,7 ± 0,8	230,9 ± 18,7
		CV (%)	7,21	2,56	4,92	11,82	7,80	8,09
		ER (%)	-8,08	-0,80	-5,90	-2,94	-3,37	-7,65
	2 dias em geladeira (4°C)	Recuperação (ng/mL ± dp)	61,3 ± 0,5	400,3 ± 7,4	23,0 ± 2,2	453,4 ± 34,4	9,6 ± 1,3	236,0 ± 18,2
		CV (%)	0,82	1,84	9,73	7,59	13,16	7,71
		ER (%)	2,08	0,08	-8,18	-9,32	-3,69	-5,61
PLASMA	Curta duração (4h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	53,4 ± 0,5	384,4 ± 12,7	23,1 ± 3,1	454,4 ± 34,0	8,9 ± 0,4	229,3 ± 2,9
		CV (%)	0,88	3,31	13,32	7,48	4,85	1,28
		ER (%)	-10,93	-3,91	-7,71	-9,11	-10,50	-8,27
	Pós-processamento (6h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	53,5 ± 3,4	370,3 ± 24,0	24,0 ± 1,5	494,8 ± 27,9	9,9 ± 0,8	261,7 ± 3,0
		CV (%)	6,36	6,49	6,04	5,65	7,76	1,15
		ER (%)	-10,80	-7,43	-3,81	-1,05	-1,47	+4,67
	3 Ciclos de descongelamento (12h)	Recuperação (ng/mL ± dp)	52,8 ± 2,6	362,1 ± 25,3	27,2 ± 2,5	486,4 ± 40,0	10,5 ± 0,1	255,1 ± 5,3
		CV (%)	4,86	6,99	9,23	8,22	0,89	2,09
		ER (%)	-12,04	-9,46	+8,86	-2,72	+4,83	+2,04
	Longa duração (10 dias)	Recuperação (ng/mL ± dp)	62,1 ± 3,9	390,7 ± 28,3	26,4 ± 3,5	506,5 ± 47,9	9,1 ± 0,6	226,4 ± 9,4
		CV (%)	6,29	7,24	13,09	9,45	6,50	4,14
		ER (%)	+3,58	-2,32	+5,77	+1,31	-8,88	-9,46

Dados: Temperatura do ciclos de descongelamento e longa duração ocorreram à -80°C. dp, desvio padrão; CV, coeficiente de variação; ER, erro relativo.

4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado na quantificação dos fármacos levodopa, carbidopa e entacapona e também dos metabólitos originados da levodopa (3-O-metildopa e dopamina). Foram analisadas amostras de plasma de doze voluntários que estavam em tratamento com o medicamento Stalevo® contendo 100 mg de levodopa, 25 mg de carbidopa e 200 mg de entacapona. Os resultados estão apresentados na Tabela 18. Conforme pode ser verificado, os valores encontrados para a 3-O-metildopa e dopamina são significativamente baixos, o que denota que a dose de carbidopa e entacapona é suficiente para reduzir a atividade enzimática das enzimas periféricas conversoras da levodopa (DAA e COMT) contribuindo, portanto, para aumentar a disponibilidade da levodopa no cérebro. Os baixos níveis de 3-O-metildopa e dopamina determinados no plasma dos pacientes também mostram que o novo método é sensível o suficiente para detectar e quantificar estes analitos mesmo em pequenas concentrações plasmáticas. O único fármaco que não foi determinado foi a tolcapona, pois este, não fazia parte da composição do medicamento. Diante desses resultados, o novo método mostrou ser capaz de quantificar os analitos em estudo em amostras reais (plasma humano), podendo ser utilizado como uma ferramenta para o monitoramento clínico de pacientes com doença de Parkinson.

TABELA 18: CONCENTRAÇÃO DA LEVODOPA, CARBIDOPA, ENTACAPONA, TOLCAPONA, 3-O-METILDOPA E DOPAMINA NOS PLASMAS DOS VOLUNTÁRIOS

Pacientes	Analitos					
	Levodopa (ng/mL)	Carbidopa (ng/mL)	Entacapona (ng/mL)	Tolcapona (ng/mL)	3-O- metildopa (ng/mL)	Dopamina (ng/mL)
1	264,0	61,0	1127,0	ND	20,0	53,0
2	566,0	86,0	3358,0	ND	26,0	61,0
3	468,0	87,0	1312,0	ND	33,0	76,0
4	40,0	19,0	210,0	ND	11,0	54,0
5	447,0	48,0	1742,0	ND	16,0	67,0
6	442,0	66,0	667,0	ND	27,0	78,0
7	1135,0	56,0	5336,0	ND	20,0	53,0
8	674,0	52,0	2699,0	ND	33,0	59,0
9	645,0	66,0	1419,0	ND	48,0	56,0
10	187,0	44,0	1502,0	ND	13,0	32,0
11	150,0	27,0	1370,0	ND	16,0	49,0
12	574,0	41,0	1648,0	ND	22,0	62,0

Dados: Dados obtidos após 1 hora da administração do medicamento; ND, não detectado.

5 CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-EM/EM mostrou-se adequado para quantificação de levodopa, carbidopa, entacapona, tolcapona, 3-O-metildopa e dopamina em plasma humano. Os parâmetros da validação indicaram que o método é sensível, seletivo, linear, preciso, exato e livre de efeito residual e de matriz. Os analitos permaneceram estáveis em solução por até 4 horas mantidos em bancada (21 °C) e armazenados por 2 dias em geladeira (4 °C). A estabilidade dos analitos em plasma foi de 4 horas sobre a bancada (21 °C), 6 horas no gerenciador de amostras (5 °C), 10 dias congelados (-80 °C) e durante três ciclos de congelamento e descongelamento (-80 °C, 12 horas cada ciclo).

Mediante os métodos disponíveis na literatura, o novo método apresentou alta sensibilidade e capacidade de monitorar simultaneamente os compostos de interesse com alta seletividade mesmo em uma matriz complexa como o plasma. O método foi aplicado com sucesso em amostras de plasma de pacientes com doença de Parkinson que utilizavam o medicamento Stalevo (Novartis®). Os resultados demonstraram a presença de níveis distintos dos fármacos e dos metabólitos nos plasmas dos voluntários, mostrando a variabilidade endógena de cada indivíduo. Esses resultados sugerem que o novo método pode ser utilizado como uma ferramenta bioanalítica no auxílio do tratamento de pacientes com doença de Parkinson, uma vez que a partir do monitoramento em plasma dessas substâncias, é possível realizar um ajuste de dose, e assim garantir a segurança e eficácia clínica durante o tratamento.

REFERÊNCIAS

BALLANGER, B.; POISSON, A.; BROUSSOLLE, E.; THOBOIS, S. Functional imaging of non-motor signs in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 315, n. 1-2, p. 9-14, 15 abril 2012.

BAKER, M.; GERSHANIK, O. S. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Parkinson's disease. In: SARACENO, B. **Neurological disorders: a public health approach**. Genebra, Suíça: WHO Press, 2006. cap 3.8.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso**. 2ª. ed., Porto Alegre, Editora Artmed, 2002.

BLAHOVÁ, E.; BRANDSTETEROVÁ, E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. **Chemical Papers**, v. 58, n. 5, p. 362-373, 2004.

BLANDINI, F.; MARTIGNONI, E.; PACCHETTI, C.; DESIDERI, S.; RIVELLINI, D.; NAPPI, G. Simultaneous determination of L-dopa and 3-O-methyldopa in human platelets and plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 700, n. 1-2, p. 278-282, 24 outubro 1997.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. **Experimental Neurology**, v. 212, n. 1, p. 226-229, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS n. 228, de 10 de maio de 2010. Aprovar, na forma do Anexo desta Portaria, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença de Parkinson. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 ago. 2010a.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª. ed. Brasília: ANVISA, 2010b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 maio 2012.

BRITISH, PHARMACOPOEIA. ed. London: The Stationery Office, 2009.

BUCK, K.; VOEHRINGER, P.; FERGER, B. The α_2 adrenoceptor antagonist idazoxan alleviates L-DOPA-induced dyskinesia by reduction of striatal dopamine levels: na *in vivo* microdialysis study in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 2, p. 444-452, 2010.

BUGAMELLI, F.; MARCHESSELLI, C.; BARBA, E.; RAGGI, M. A. Determination of l-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC–ED. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 562-567, 2011.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CÉSAR, I. C.; BYRRO, R. M. D.; CARDOSO, F. F. S. S.; MUNDIM, I. M.; TEIXEIRA, L. S.; SILVA, E. P.; GOMES, S. A.; BONFIM, R. R.; PIANETTI, G. A. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 9, p. 943-948, setembro 2011a.

CÉSAR, I. C.; BYRRO, R. M. D.; CARDOSO, F. F. S. S.; MUNDIM, I. M.; TEIXEIRA, L. S.; GOMES, S. A.; BONFIM, R. R.; PIANETTI, G. A. Simultaneous quantitation of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by HPLC–ESI-MS/MS: Application for a pharmacokinetic study with a levodopa/benserazide formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 1094-1100, 15 dezembro 2011b.

CHEMICALIZE. Disponível em: <<http://www.chemicalize.org/>>, acesso em 21/08/2012.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1^a. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DASS, C. Basics of mass spectrometry. In: _____. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007a. p. 03-14.

DASS, C. Modes of ionization. In: _____. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007b. p. 15-65.

EUROPEAN, Pharmacopoeia. 6^a. Ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007.

Food and Drug Administration. **Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Services, 2001.

FLANAGAN, R. J.; MORGAN, P. E.; SPENCER, E. P. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 6-7, p. 530-538, junho-julho 2006.

FOSBERG, M. M.; HUOTARI, M.; SAVOLAINEN, J.; MÄNNISTÖ, P. T. The role of physicochemical properties of entacapone and tolcapone on their efficacy during local intrastriatal administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 4, p. 503-511, abril 2005.

GONÇALVES, D.; ALVES, G.; SILVA, P. S.; FALCÃO, A. Bioanalytical chromatographic methods for the determination of catechol-O-methyltransferase inhibitors in rodents and human samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 710, p. 17-32, 2012.

GONZÁLEZ, R. R.; FERNÁNDEZ, R. F.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; PÉREZ, M. L. G. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 2, p. 187-194, 15 junho 2011.

GOOLE, J.; AMIGHI, K. Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 1-15, 2009.

HEIKKINEN, H.; VARHE, A.; LAINE, T.; PUTTONEN, J.; KELA, M.; KAAKKOLA, S.; REINIKAINEN, K. Entacapone improves the availability of L-dopa in plasma by decreasing its peripheral metabolism independent of L-dopa/carbidopa dose. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 363-371, outubro 2002.

HEIZMANN, P.; SCHMITT, M.; LEUBE, J.; MARTIN, H.; SANER, A. Determination of the catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone and three of its metabolites in animal and human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 730, n. 2, p. 153-160, 9 julho 1999.

HOFFMAN, B. B.; LEFKOWITZ, R. J. Adrenergic agonists and antagonists. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12^a. ed.: McGraw-Hill Professional, 2010. cap. 12.

HOLTBACK, U.; APERIA, A. C. Paracrine regulation of renal function by dopamine. In: Alpern, R. J.; HEBERT, S. C. **Seldin and Giebisch's The Kidney**. 4^a. ed.: Academic Press, 2008. cap. 18.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

JIANG, W.; LV, L.; ZHOU, S.; HUANG, X.; SHI, X.; LV, C.; WU, L.; XU, C. Simultaneous determination of L-dopa and its prodrug (S)-4-(2-acetamido-3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,2-phenylene diacetate in rat plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 751-754, 02 novembro 2010.

JORGA, K.; FOTTELER, B.; HEIZMANN, P.; GASSER, R. Metabolism and excretion of tolcapone, a novel inhibitor of catechol-O-methyltransferase. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 513-520, outubro 1999.

JORGA, K.; FOTTELER, B.; BANKEN, L.; SNELL, P.; STEIMER, J. L. Population pharmacokinetics of tolcapone in parkinsonian patients in dose finding studies. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 39-48, janeiro 2000.

KARIMI, M.; CARL, J. L.; LOFTIN, S.; PERLMUTTER, J. S. Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 836, n. 1-2, p. 120-123, 19 maio 2006.

KARLSSON, M; WIKBERG, T. Liquid chromatographic determination of a new catechol-O-methyltransferase inhibitor, entacapone, and its Z-isomer in human plasma and urine. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, v. 10, n. 8, p. 593-600, agosto 1992.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.

KELLER, G. A.; CZERNIUK, P.; BERTUOLA, R.; SPATZ, J. G.; ASSEFI, A. R.; GIROLAMO, G. Comparative bioavailability of 2 tablet formulations of levodopa/benserazide in healthy, fasting volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 4, p. 500-510, 2011.

KHEDR, E. M.; FETOH, N. A.; KHALIFA, H.; AHMED, M. A.; BEH, K. M. A. Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson's disease patients. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 115, n. 6, p. 673-677, junho 2013.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: Parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Annals of Neurology**, v. 59, p. 591-596, abril 2006.

LAWLOR, P. A.; DURING, M. J. Gene therapy for Parkinson's disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1-18, março 2004.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055-2066, junho 2009.

LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. Neurotransmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12^a ed.: McGraw-Hill Professional, 2010. cap. 8.

MA, J., *et al.* A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 2, p. 219-226, 2008.

MÄNNISTÖ, P, T.; KAAKKOLA, S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 593-628, 1 dezembro 1999.

MOURADIAN, M.M.; HEUSER, I. J.; BARONTI, F.; CHASE, T. N. Modification of central dopaminergic mechanisms by continuous levodopa therapy for advanced Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 27, n. 1, p. 28-23, janeiro 1990.

MUNOZ, J. L. M.; MOLINA, F. G.; MOLINA, M. G.; TUDELA, J.; CÁNOVAS, F. G.; LOPEZ, J. N. R. Kinetic characterization of the oxidation of carbidopa and benzeraride by tyrosinase and peroxidase. **Bioscience, Biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 6, p. 1308-1313, 07 junho 2009.

MUZZI, C.; BERTOCCI, E.; TERZUOLI, L.; PORCELLI, B.; CIARI, I.; PAGANI, R.; GUERRANTI, R. Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and α -methyldopa by HPLC. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 253-258, abril-maio 2008.

NAGAI, M.; KUBO, M.; NISHIKAWA, N.; NOMOTO, M. Fluctuation in plasma entacapone concentrations in accordance with variable plasma levodopa concentrations. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 16, p. 697-699, 2010.

NAGAYAMA, H.; UEDA, M.; KUMAGAI, T.; TSUKAMOTO, K.; NISHIYAMA, Y.; NISHIMURA, S.; HAMAMOTO, M.; KATAYAMA, Y. Influence of ageing on the pharmacokinetics of levodopa in elderly patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 17, p. 150-152, 2011.

NOVÁKOVÁ, L; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, 10 dezembro 2009.

NUNES, T.; MACHADO, R.; ROCHA, J. F.; LOPES, C. F.; COSTA, R.; TORRÃO, L.; LUOREIRO, A. I.; FALCÃO, A.; SILVA, M. V.; WRIGHT, L.; ALMEIDA, L.; SILVA, P. S. Pharmacokinetic-pharmacodynamic interaction between nebicapone and controlled-release levodopa/benserazide: a single-center, phase I, double-blind, randomized,

placebo-controlled, four-way crossover study in healthy subjects. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 10, p. 2258-2271, outubro 2009.

PAN, L.; GUO, Y.; LI, Z.; CHEN, J.; JIANG, T.; YU, Y. Simultaneous Determination of Levodopa, Benserazide and 3-O-Methyldopa in Human Serum by LC-MS-MS. **Chromatographia: An International Journal for Rapid Communication in Chromatography, Electrophoresis and Associated Techniques**, v. 72, n. 7-8, p. 627-633, 22 agosto 2010.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. **The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 01 maio 2002.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p. 263-275, 5 março 2003.

RONDELLI, I.; ACERBI, D.; MARIOTTI, F.; VENTURA, P. Simultaneous determination of levodopa methyl ester, levodopa, 3-O-methyldopa and dopamine in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 653, n. 1, p. 17-23, 18 fevereiro 1994.

SAGAR, K. A.; SMYTH, M. R. Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and their metabolites in human plasma and urine samples using LC-EC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, n. 3, p. 613-624, abril 2000.

SAXER, C.; NIINA, M.; NAKASHIMA, A.; NAGAE, Y.; MASUDA, N. Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 2, p. 299-305, 5 abril 2004.

SEEBERGER, L. C. HAUSER, R. A. Optimizing bioavailability in the treatment of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 791-800, 2007.

SHASTRY, B. S. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. **Neuroscience Research**, v. 41, p. 5-12, 2001.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em
 <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>>. Acesso em
 20/12/2012.

SMITH, K. S.; SMITH, P. L.; HEADY, T. N.; TRUGMAN, J. M.; HARMAN, W. D.; MACDONALD, T. L. In vitro metabolism of tolcapone to reactive intermediates: Relevance to tolcapone liver toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 123-128, 30 janeiro 2003.

STACY, M.; BOWRON, A.; GUTTMAN, M.; HAUSER, R.; HUGHES, K.; LARSEN, J. P.; WITT, P.; OERTEL, W.; QUINN, N.; SETHI, K.; STOCCHI, F. Identification of motor and nonmotor wearing-off in Parkinson' disease: Comparison of a patient questionnaire versus a clinician assessment. **Movement Disorders**, v. 20, n. 6, p. 726-733, junho 2005.

STANDAERT, D. G.; YOUNG, A. B. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12^a. ed.: McGraw-Hill Professional, 2010. cap. 22.

SUN, J.; TUNGELN, L. S.; HINES, W.; BEGER, R. D. Identification of metabolite profiles of the catechol-O-methyl transferase inhibitor tolcapone in rat urine using LC/MS-based metabonomics analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 24, p. 2557-2565, 15 agosto 2009.

TITUS, D. C.; AUGUST, T. F.; YEH, K. C.; EISENHANDLER, R.; BAYNE, W. F.; MUSSON, D. G. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of carbidopa, levodopa and 3-O-methyldopa in plasma and carbidopa, levodopa and dopamine in urine using electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 534, p. 87-100, 1990.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDINS, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

UITTI, R. J. Treatment of Parkinson's disease: focus on quality of life issues. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, n. 1, p. S34-S36, janeiro 2012.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 32^a. ed: Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2008.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. Disponível em <<http://www.usp.org/pt/padroes-de-referencia/localize-um-padrao-de-referencia>>. Acesso em 17/12/2012.

van CALCAR, S. C.; NEY, D. M. Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 8, p. 1201-1210, agosto 2012.

VEMIC, A.; STOJANOVIC, B. J.; STAMENKOVIC, I.; MALENOVIC, A. Chaotropic agents in liquid chromatographic method development for the simultaneous analysis of levodopa, carbidopa, entacapone and their impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 77, p. 9-15, 15 abril 2013.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 30 novembro 2011.

WAL, P.; KUMAR, B.; BHANDARI, A.; RAI, A. K.; WAL, A. Bioanalytical method development-Determination of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 333-347, 2010.

YADAV, M.; DIXIT, P.; TRIVEDI, V.; GANDHI, A.; SENGHER, A.; GUTTIKAR, S.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P. S. Chromatographic separation of (*E*)- and (*Z*)-isomers of entacapone and their simultaneous quantitation in human plasma by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 5-6, p. 533-540, 15 fevereiro 2009.

ZHANG, J.; SULZER, D. Pharmacokinetics of L-dopa in plasma and extracellular fluid of striatum in common marmosets. **Brain Research**, v. 993, n. 1-2, p. 54-58, 28 agosto 2003.

ZHU, K. Y.; FU, Q.; LEUNG, K. W.; WONG, Z. C. F.; CHOI, R. C. Y.; TSIM, K. W. K. The establishment of a sensitive method in determining different neurotransmitters simultaneously in rat brains by using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 11-12, p. 737-742, 1 abril 2011.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Raquel de Oliveira Vilhena, Rômulo Pereira Ribeiro, Dr. Roberto Pontarolo, Dr. Marco André Cardoso, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o Senhor, ou Senhora, que possui idade acima de 50 anos, diagnosticado(a) com doença de Parkinson e submetido(a) a tratamento medicamentoso utilizando o fármaco levodopa isolado ou associado com uma ou mais das seguintes substâncias: carbidopa, benzerazida, entacapona e tolcapona, a participar de um estudo intitulado “Desenvolvimento e validação de método por CLAE-EM/EM e CLAE-FLU para análise simultânea de fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson”. O presente trabalho tem por objetivo desenvolver métodos de análise para quantificação de fármacos envolvidos no tratamento da doença de Parkinson em sangue (levodopa, benzerazida, carbidopa, entacapona e tolcapona) e de alguns dos compostos gerados pelo metabolismo dos medicamentos acima citados (3-O-metildopa, dopamina, adrenalina, noradrenalina, ácido homovanílico e vanililmandélico). Por este motivo, para o sucesso de nossa pesquisa existe a necessidade de realizarmos análises em sangue destes pacientes. Para isso, não será necessário realizar coletas de sangue pelo nosso grupo de pesquisa. As amostras utilizadas serão provenientes de exames de rotina realizados no ambulatório do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP).

- a) O objetivo desta pesquisa é desenvolver métodos de análise para quantificação de fármacos envolvidos no tratamento da doença de Parkinson em plasma humano (levodopa, benzerazida, carbidopa, entacapona e tolcapona) e de alguns dos compostos gerados pelo metabolismo dos medicamentos acima citados (3-O-metildopa, dopamina, adrenalina, noradrenalina, ácido homovanílico e vanililmandélico), em pacientes acima de 50 anos, diagnosticados com doença de Parkinson e submetidos a tratamento medicamentoso utilizando o fármaco levodopa isolado ou associado com uma ou mais das seguintes substâncias: carbidopa, benzerazida, entacapona e tolcapona.
- b) Caso você concorde em participar da pesquisa, não será necessário realizar outras coletas de sangue.
- c) Não será necessário que você se desloque para qualquer lugar. As coletas de sangue serão realizadas no IPPPP, por profissionais especializados.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____ Orientado(s) _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- d) Os procedimentos necessários para a realização da pesquisa envolvem alguns riscos, como um desconforto durante a introdução da agulha. Como medida para amenizar esse risco, a coleta será realizada por enfermeiros altamente treinados e qualificados. O ambiente será adequado, respeitando-se as regras de assepsia. Quanto ao risco de perda de confidencialidade, qualquer informação que for divulgada em relatório ou publicação, será feita sob uma forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.
- e) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: (1) adequação da dose dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Parkinson; (2) diminuição dos efeitos colaterais causados pelo uso a longo prazo dos fármacos; (3) melhora na qualidade de vida do paciente. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- f) Os pesquisadores responsáveis pelo projeto encontram-se listados abaixo e poderão ser contatados de segunda a sexta-feira no horário comercial, na Universidade Federal do Paraná (Av. Prefeiro Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico - Curitiba - PR) e no Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Av. Silva Jardim, 1632 – Água Verde - Curitiba - PR). São os responsáveis pela pesquisa e poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito da sua participação:

Equipe responsável pelo projeto e e-mail	Formação	Função	Contato
Raquel de Oliveira Vilhena	Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela UFPR	Pesquisadora	(47)9983-9141
Rômulo Pereira Ribeiro romulo.p.ribeiro@gmail.com	Mestrando em Ciências Farmacêuticas pela UFPR	Pesquisador	(41)8441-4584 (41)3360-4106
Roberto Pontarolo pontarolo@ufpr.br	Doutor em Bioquímica UFPR	Orientador	(41)3360-4094
Marco André Cardoso marcoacardoso@yahoo.com.br	Doutor em Bioquímica UFPR	Co-orientador	(41)3310-1035

- k) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____ Orientado(s) _____

- l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser avaliadas por médicos e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob uma forma codificada, para que a **confidencialidade** seja mantida.
- m) Após as análises da amostra, essa será colocada em recipiente apropriado e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos à saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.
- n) Todas as despesas que se façam necessárias para a realização desta pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- o) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Curitiba, __ / __ / _____

Pesquisador responsável